



Ricardo Palácios Tomás Moniz Rebelo

Licenciado em Engenharia do Ambiente

**Produção de Biodiesel a partir de
Microalgas. Revisão Bibliográfica e
Contribuição para a sua Produção em
Portugal**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia do Ambiente perfil Engenharia Sanitária

Orientador: Professor Doutor António Manuel Fernandes
Rodrigues, Professor Auxiliar da UNL/FCT

Presidente: Prof. Doutor Pedro Manuel Hora Santos Coelho
Arguente: Prof. Doutora Maria da Conceição Carrilho Raimundo dos Santos
Vogal: Prof. Doutor António Manuel Fernandes Rodrigues



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Março, 2014

Produção de Biodiesel a partir de Microalgas. Revisão Bibliográfica e Contribuição para a sua Produção em Portugal

© Ricardo Palácios Tomás Moniz Rebelo

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Aos meus avós pela educação, carinho e apoio incondicional.

À minha mãe e irmã por acreditarem em mim e pelo seu apoio, sem elas teria sido muito mais difícil.

À minha namorada que nunca me deixou desistir e que me apoiou incondicionalmente, mesmo quando eu achava que era impossível, sem ela teria sido impossível.

Aos meus amigos de sempre, pela amizade e companheirismo, a vida sem eles não tinha piada nenhuma.

A todos os professores que participaram ativamente na minha educação, percurso escolar e académico.

Ao Professor Doutor António Fernandes Rodrigues pela orientação do presente trabalho de dissertação, pelo esforço, disponibilidade, paciência e apoio que demonstrou.

Resumo

A sociedade em que vivemos é absolutamente energético-dependente. As projeções da Agência Internacional de Energia apontam para que em 2035 ainda cerca de 75% da procura por energia primária seja satisfeita por energias fósseis. De referir que 61,5% do petróleo consumido em 2010 foi apenas para o setor dos transportes. Este setor, é um setor com um grande *deficit* de rendimento e ainda em expansão.

De forma a fazer face a este problema, a UE estabeleceu através da Diretiva 2009/28/CE, transposta para a legislação portuguesa através do Decreto-lei nº117/2010, a promoção da produção e da utilização de biocombustíveis e de outros combustíveis renováveis no espaço comunitário, no âmbito do desenvolvimento sustentável da redução da dependência das importações de energia.

Atualmente os biocombustíveis apresentam-se como o principal substituto dos combustíveis fósseis no setor dos transportes, cuja força motriz carece de alternativas capazes de enfrentar simultaneamente os problemas ambientais e o aumento da procura.

O presente trabalho de dissertação tem como principal objetivo uma revisão bibliográfica acerca das etapas de produção de biodiesel a partir de microalgas e perceber qual o seu potencial contributo para atingir as metas de incorporação definidas na legislação portuguesa. Para isso, foi efetuada uma revisão dos métodos utilizados na produção de biodiesel de forma a eleger dados passíveis de serem utilizados no modelo de produtividade primária.

Através da equação de Verhulst e Pearl, adaptada ao balanço de massas de um reator em contínuo, chegou-se à conclusão de que a cultura de microalgas em águas residuais afluentes a uma ETAR, que sirva uma população de 25000 habitantes, tem o potencial de produzir cerca de 115 toneladas de biodiesel por ano, o que representa cerca de 0,04% do biodiesel incorporado no gasóleo, no ano de 2013. Para atingir 10% do gasóleo consumido em Portugal seria necessária uma área equivalente a cerca de 2589 ha. Embora estes valores sejam reduzidos, concluiu-se também que a cultura de microalgas permite reduzir em cerca de 15,6% as emissões de CO₂eq associadas a uma ETAR do tipo lamas activadas. A concentração máxima, a taxa de crescimento e a produção lipídica são fatores de extrema importância quando o objetivo é a produção de biodiesel.

No atual estado de arte, o biodiesel microalgal ainda sofre de alguns constrangimentos, que o impedem de se afirmar como substituto do biodiesel de primeira e segunda geração. Os balanços energéticos ligeiramente positivos para os elevados custos de produção por litro, mostram que ainda é necessário, não só uma melhoria na eficiência do sistema, como também, perceber como se atinge a maior taxa de crescimento com maior conteúdo lipídico.

Palavras-chave: Microalgas, águas residuais, tratamento terciário, produção de biodiesel, Portugal, revisão bibliográfica

Abstract

We live in a society which is absolutely energy-dependent. The IEA projections indicate that, in 2035, about 75% of primary energy demand is met by fossil energies. Noted that 61,5% of the oil consumed in 2010 was only for the transport sector. This sector has a large deficit of efficiency and it's still expanding.

In order to face this problem, the EU established the Directive 2009/28/EC, transposed into Portuguese law by Decree -Law nº117/2010, to promote the production and use of biofuels and other renewable fuels, in community space within the sustainable development of reducing dependence on energy imports.

Currently, biofuels are presented as the main substitute for fossil fuels in the transport sector, whose driving force lacks alternatives capable of simultaneously resolve environmental problems and increased demand.

This dissertation aims a literature review about the stages of biodiesel production from microalgae and tries to realize their potential contribution to achieve the goals of incorporation, defined in Portuguese legislation. For that, a bibliographic review of the methods used in the production of biodiesel was made, in order to choose data that could be used in the productivity model.

By Verhulst and Pearl equation, adapted to the mass balance of a continuous reactor, it was concluded that the cultivation of microalgae in affluent wastewater to a treatment plant, serving a population of 25000 inhabitants, has the potential to produce about 115,25 tonnes of biodiesel per year, which represents about 0.04% of biodiesel in diesel consumed in Portugal, in 2013. To achieve 10% of the diesel consumed in Portugal would require an area equivalent to about 2589 ha. It was also found that culture of microalgae can reduce by about 15.6% of the emissions of CO₂eq associated with a secondary treatment in a WWTP.

Maximum concentration, the rate of growth and lipid productivity are factors of extreme significance when the aim is the production of biodiesel.

In the current state of the art, the microalgal biodiesel still suffers from some constraints that prevent it from asserting itself as the surrogate of biodiesel from first and second generation. The only slightly positive energy ratio for the high production costs per litre, show that it is still necessary, not only an improvement in the efficiency of the system, but also understand how to achieve the highest growth rate with higher lipid content.

Keywords: Microalgae, wastewater, tertiary treatment, biodiesel production, Portugal, literature review

Índice

Agradecimentos.....	v
Resumo.....	vii
Abstract.....	ix
Índice.....	xi
Lista de figuras.....	xv
Lista de tabelas.....	xvii
Abreviaturas.....	xix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. A inexorável dependência energética.....	1
1.2. Biocombustíveis.....	3
1.3. Biocombustíveis de primeira geração.....	4
1.4. Biocombustíveis de segunda geração.....	5
1.5. Investigação e desenvolvimento.....	5
1.6. Microalgas.....	6
1.7. Objetivos da presente dissertação.....	8
1.8. Estrutura da dissertação.....	9
2. METODOLOGIA.....	11
3. PRINCIPAIS LIMITAÇÕES DOS ESTUDOS CONSULTADOS.....	13
4. Revisão bibliográfica.....	15
4.1. A ineficiência e impactes dos biocombustíveis de primeira e segunda geração.....	15
4.1.1. Eficiência.....	15
4.1.2. Competição com o setor alimentar.....	16
4.1.3. Pegada da água.....	17
4.1.4. Perda de biodiversidade e desertificação.....	17
4.1.5. Balanços de carbono negativos.....	18
4.2. Biodiesel.....	18
4.3. Microalgas como matéria-prima para a produção de biodiesel.....	19
4.4. Fluxograma.....	23

4.5.	Seleção da espécie de microalga	24
4.6.	Produção de biomassa algal	24
4.6.1.	Metabolismo	25
4.6.2.	Potenciadores da produtividade lipídica.....	26
4.6.3.	Águas residuais como fonte de nutrientes e CO ₂ industrial como fonte de carbono.....	28
4.6.4.	Biorreactores	33
4.6.4.1.	Lagoas fotossintéticas de alta carga	33
4.6.4.2.	Fotobiorreactores.....	35
4.6.4.2.1.	Fotobiorreactores Flat-Plate	35
4.6.4.2.2.	Fotobiorreactores tubulares	37
4.6.4.2.3.	Fotobiorreactores airlift.....	38
4.6.4.3.	Vantagens e desvantagens dos biorreactores.....	40
4.6.4.4.	Sistemas híbridos.....	41
4.7.	Colheita e secagem da biomassa microalgal	43
4.7.1.	Colheita da biomassa.....	43
4.7.1.1.	Floculação	44
4.7.1.2.	Flotação	46
4.7.2.	Espessamento/Secagem.....	46
4.8.	Extração do conteúdo lipídico	48
4.8.1.	Extração por solventes orgânicos	49
4.8.2.	Extração por CO ₂ supercrítico.....	51
4.9.	Métodos de conversão do óleo em biodiesel.....	52
4.9.1.	Liquefação hidrotermal	53
4.10.	Análise Ciclo de Vida.....	56
5.	Contribuição das microalgas para a produção de biodiesel.....	63
5.1.	Dedução do modelo.....	64
5.2.	Variação da produtividade volumétrica segundo as diferentes variáveis.....	67
5.2.1.	Produtividade volumétrica vs. Concentração máxima de biomassa.....	67
5.2.2.	Produtividade volumétrica vs. Taxa específica de crescimento	67

5.2.3.	Produtividade volumétrica vs. Tempo de retenção hidráulico	68
5.3.	Apresentação do caso de estudo	69
5.3.1.	Descrição dos cenários	70
5.3.2.	Caracterização do cenário conservativo	71
5.3.3.	Caracterização do cenário otimista.....	72
5.4.	Comparação dos resultados obtidos nos cenários considerados.....	74
5.5.	Pegada de Carbono	75
6.	Conclusões e sugestões de trabalho futuro	81
7.	Bibliografia.....	85

Lista de figuras

Figura 1 - Comparação do consumo de petróleo por setor em 1973 e 2010.	2
Figura 2 - Projeção de crescimento do número de veículos ligeiros.	2
Figura 3 – Investimento mundial em milhões de euros no setor da energia.....	6
Figura 4 - Lagoas fotossintéticas de alta carga da <i>Earthrise Nutritionals</i> , em Califórnia, E.U.A.	7
Figura 5 - Fluxograma conceptual do ciclo de vida da produção de biocombustível a partir de microalgas.	22
Figura 6 - Concentração de lípidos de diversas microalgas segundo o seu metabolismo.	26
Figura 7 - Concentração de biomassa e conteúdo lipídico da espécie <i>Nannochloropsis oculata</i> quando cultivada na privação de azoto. Os triângulos representam o ensaio em branco e os quadrados o ensaio em duas fases. Os simbolos a cheio representam a biomassa e os vazios o conteúdo lipidico	27
Figura 8 - Para produzir 1kg de biomassa: (a) pegada da água usando água potável (AP); (b) pegada da água usando águas residuais (AR) ou água do mar (AM); (c) Necessidade dos principais nutrientes usando AP com e sem recirculação; (d) Necessidade dos principais nutrientes com 100% de recirculação usando AP, AM e AR	29
Figura 9- Conteúdo lipídico em função do tempo entre aplicações e duração de cada aplicação.....	32
Figura 10 - Planta de uma lagoa fotossintética de alta carga.....	34
Figura 11- Corte transversal e longitudinal de um painel de um fotobiorreactor <i>flat-plate</i>	36
Figura 12- Esquema de funcionamento de um fotobiorreactor <i>flat-plate</i>	37
Figura 13 - Esquema de funcionamento de um fotobiorreactor tubular horizontal.....	38
Figura 14 - Várias configurações de fotobiorreactores <i>airlift</i>	39
Figura 15 - Corte transversal e longitudinal de um fotobiorreactor <i>airlift flat-plate</i>	41
Figura 16 - Fotobiorreactor tubular helicoidal acoplado a sistema <i>airlift</i>	42
Figura 17 - Fotobiorreactor <i>α-shape</i>	42
Figura 18 - Custo (\$US), emissão de GEE e consumo de energia por tonelada de microalga seca para polímero cationico, cloreto de ferro e sulfato de alumínio.....	45
Figura 19 - Energia consumida e emissões de GEE para algumas tecnologias de secagem.	48
Figura 20 – Eficiência exergética e total de irreversibilidades da utilização de três solventes diferentes na extração de 100000 toneladas de biodiesel/ano.....	50
Figura 21 – Fluxograma da extração do conteúdo lipídico por hexano	50
Figura 22 – Diagrama de fases referente ao CO ₂	51
Figura 23 – Composição dos ácidos gordos segundo a extração utilizada.....	52
Figura 24 – Reação de transesterificação.	53
Figura 25 – Diagrama energético da conversão da biomassa em biodiesel usando transesterificação .	54
Figura 26 – Diagrama energético da conversão da biomassa em biodiesel usando HTL.	55

Figura 27 – Comparação dos impactes causados pela produção de um MJ a partir de diversas fontes de biodiesel e diesel fossil.....	58
Figura 28 - Reultados da avaliação de impactes ambientais para os 4 cenários normalizados na produção de uma unidade funcional.....	60
Figura 29 – Reultados da avaliação de impactes ambientais para os 4 cenários normalizados na produção de uma unidade funcional (cont.).	60
Figura 30 – Variação da produtividade volumétrica em função da concentração máxima.	67
Figura 31 – Variação da produtividade volumétrica em função da taxa de crescimento.	68
Figura 32 – Variação da produtividade volumétrica em função do tempo de retenção hidráulico.	68

Lista de tabelas

Tabela 1 - Procura total de energia (Mtep), fontes e consumo do setor dos transportes. Previsão para 2035.....	1
Tabela 2 - Comparação de fontes de biodiesel.....	15
Tabela 3 - Pegada da água das varias fases do ciclo de produção de biocombustíveis (litros de água consumidos por cada litro de combustível produzido).....	17
Tabela 4 – Produtividade primária e eficiência fotossintética de algumas culturas de plantas terrestres e microalgas.	20
Tabela 5 - Produtividade primária e conteúdo lipídico de algumas espécies de microalgas.....	21
Tabela 6 – Efeito de diferentes concentrações de salinidade e da radiância no conteúdo e produção lipídica.....	28
Tabela 7 - Taxas de crescimento e percentagem de remoção de nutrientes para <i>Chlorella vulgaris</i> e <i>Scenedesmus obliquus</i> em diferentes tipos de águas residuais.....	31
Tabela 8 – Tabela sumária das vantagens e desvantagens das lagoas fotossintéticas e fotobiorreactores.	40
Tabela 9 - Tabela sumária de vários coagulantes sobre a dose ótima, turbidez, SST e percentagem de biomassa algal recolhida	44
Tabela 10- Comparação de diversos processos de secagem da biomassa.....	47
Tabela 11 – Balanço energético da produção de biodiesel utilizando transesterificação e digestão anaeróbia dos resíduos.....	55
Tabela 12 – Balanço energético da produção de biodiesel utilizando HTL.....	56
Tabela 13 – Caracterização dos diferentes cenários.....	59
Tabela 14 – Resultados do modelo em comparação com o <i>diesel</i> fóssil.....	62
Tabela 15 - Metas de incorporação de biocombustíveis.....	63
Tabela 16 – Dados relativamente ao consumo de gasóleo e biodiesel por parte do setor dos transportes durante o ano de 2013 e em janeiro de 2014. Percentagem de incorporação de biodiesel no gasóleo..	63
Tabela 17 – População servida e caracterização do efluente ao bioreactor.....	69
Tabela 18 - Total de azoto e fósforo a ser removido.....	70
Tabela 19 – Dimensões de cada painel do fotobiorreactor.....	70
Tabela 20 – Parâmetros utilizados no cenário conservativo.....	71
Tabela 21 – Processos e eficiências utilizadas no cenário conservativo.	72
Tabela 22 - Parâmetros utilizados no cenário otimista.....	72
Tabela 23 - Processos e eficiências utilizadas no cenário otimista.	73
Tabela 24 – Variáveis do modelo que influenciam a produtividade de biomassa e produção de biodiesel. Produção final de biodiesel segundo cada cenário e área ocupada pelos reatores.....	74

Tabela 25 – Biodiesel produzido segundo CORN e comparação com o biodiesel incorporado nos transportes.	75
Tabela 26 – Área necessária para incorporar 10% do biodiesel consumido em Portugal e comparação com o estudo de Figueiredo (2011)	75
Tabela 27 – Emissões de dióxido de carbono equivalente ao longo do processo de tratamento da ETAR referida e emissões totais.	76
Tabela 28 – Massa de CO ₂ necessária para satisfazer as necessidades de carbono para atingir a produtividade volumétrica de cada cenário proposto.	77
Tabela 29 – Energia necessária em cada etapa para a produção de uma tonelada de biodiesel segundo os diferentes cenários.	77
Tabela 30 – Consumo energético mensal e respectivas emissões para os diferentes cenários propostos.	78
Tabela 31 – Emissões totais finais da ETAR associada à cultura de microalgas	79

Abreviaturas

AC - acidificação

ACV – Análise Ciclo-de-Vida

$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ - Sulfato de alumínio

AM – Água do mar

AP – Água potável

APA – Agência Portuguesa do Ambiente

AR – Águas residuais

ARN - Alta eficiência usando recursos naturais

ARS - Alta eficiência usando recursos sintéticos

Bep – Barril equivalente de petróleo

BRN - Baixa eficiência usando recursos naturais

BRS - Baixa eficiência usando recursos sintéticos

CO_2 – Dióxido de carbono

CO_2SC - CO_2 supercrítico

CORN - Cenário otimista tendo em vista a remoção de nutrientes

DGEG – Direção Geral da Energia e Geologia

DCO - Depleção da camada de ozono

E - Eutrofização

EC - Efeitos carcinogénicos

EEM – Empresa de Eletricidade da Madeira

EH – Hexano

EHE - Mistura de hexano e etanol

EMC - Mistura de metanol e clorofórmio

ENC - Efeitos não carcinogénicos

ER - Efeitos respiratórios

ET - Ecotoxicidade terrestre

ETAR – Estação de tratamento de águas residuais

EUA – Estados Unidos da América

FAME – Fatty Acid Methyl Ester (Ésteres Metílicos de Ácidos Gordos)

$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ - Sulfato de ferro

FeCl_3 - Cloreto de ferro

FS - Formação de *smog*

GEE – Gases de efeito de estufa

GJ – Giga Joule

HTL - Hydrothermal liquefaction
 I&D – Investigação e Desenvolvimento
 IEA – International Energy Agency (Agência Internacional de Energia)
 INTESUSAL – Integrated Sustainable Algae
 LCA - Life Cycle Assessment (Análise Ciclo-de-Vida)
 MJ – Mega Joule
 MPa – Mega Pascal
 MSC - Metanol supercrítico
 Mtep – Milhares de toneladas de petróleo equivalente
 N₂O – Óxido nitroso
 NaOH – Hidróxido de sódio
 NH₄⁺ - Amónio
 NO₃⁻ - Nitratos
 NO_x – Óxido e dióxido de azoto
 NTU - Unidades Nefelométricas de Turbidez
 OCDE - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico
 OPEP – Organização dos Países Exportadores de Petróleo
 PAG - Potencial de aquecimento global
 Pc – Pressão crítica
 PEF - Pulse electric field (campo elétrico pulsado)
 PM₁₀ – Partículas inferiores a 10 µm
 PM_{2,5} – Partículas inferiores a 2,5 µm
 PO₄⁻³ - Ortofosfatos
 SO_x – Óxido e dióxido de enxofre
 SST – Sólidos Suspensos Totais
 TAG - Triacilglicerol
 Tc – Temperatura crítica
 UE - União Europeia
 UENR - Utilização de energia não renovável

1. INTRODUÇÃO

1.1. A inexorável dependência energética

A sociedade em que vivemos é absolutamente energético-dependente. O problema não reside nessa dependência, reside sim, no facto de esta depender do consumo constante de combustíveis de origem fóssil, que se tornaram na força motriz da geração de eletricidade de quase toda a indústria e, também, de todo o sistema de transportes global (Almeida e Silva 2009; IEA 2012c). Assim podemos afirmar que a nossa sociedade está assente numa dependência energética que não vamos conseguir satisfazer para sempre, muito menos de um ponto de vista sustentável.

Pelas projeções da International Energy Agency (2012a) (Tabela 1), podemos verificar que em 2035 cerca de 75% da procura por energia primária continua a ser proveniente de energias fósseis. De referir o caso particular da energia consumida pelo setor dos transportes, onde apenas 0,6% provém de biocombustíveis. Estes dados devem, também, ser analisados com cautela por duas razões: Primeira, a IEA (2012c) afirma que estes dados têm em conta os compromissos políticos existentes e assume que os recentemente anunciados serão implementados; segunda, a procura por energia está intimamente relacionada com o crescimento económico de cada país, logo estes valores revelam alguma fragilidade face a essa mesma instabilidade.

Tabela 1 - Procura total de energia (Mtep), fontes e consumo do setor dos transportes. Previsão para 2035.

(adaptado de IEA 2012b).

	OCDE		Não-OCDE		China		Índia		Total Mundial	
Ano	2010	2035	2010	2035	2010	2035	2010	2035	2010	2035
Procura energia primária	5404	5579	6972	11147	2416	3872	691	1516	12730	17197
Petróleo, carvão e gás	4364	3934	5609	8578	2114	3134	502	1177	10327	12980
Nuclear	596	641	122	497	19	256	7	52	719	1138
Renováveis	443	1005	1241	2073	284	483	182	286	1684	3079
Biocombustíveis	40	117	18	89	1	22	0	10	59	206
Consumo do setor dos transportes	1180	1028	844	1173	184	517	55	225	2377	3272

Um outro estudo realizado pela IEA (2012b) apresenta a escalada do consumo de crude por parte do setor dos transportes, como podemos observar na figura 1. Este é um setor com um grande *deficit* de rendimento e em que os combustíveis fósseis se encontram mais enraizados.

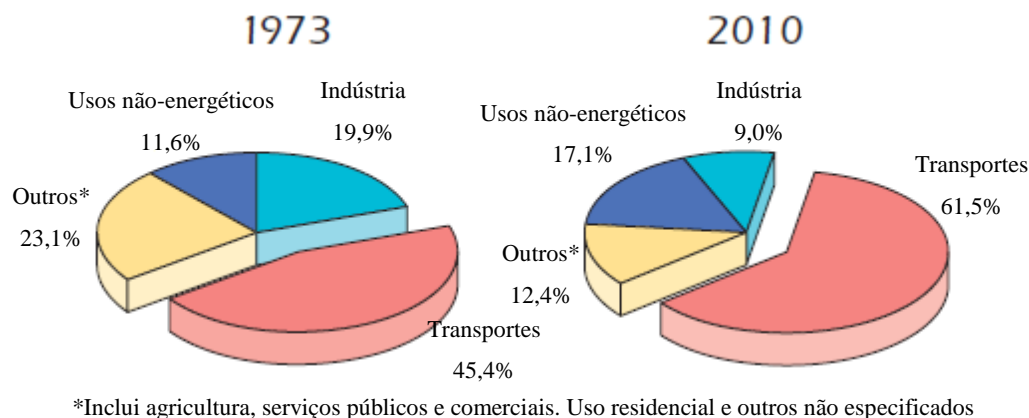


Figura 1 - Comparação do consumo de petróleo por setor em 1973 e 2010. (IEA 2012a)

De salientar ainda que o aumento do consumo de combustíveis de origem fóssil por parte do setor dos transportes não parece abrandar. Como podemos observar na figura 2, na União Europeia (UE) e nos Estados Unidos da América (EUA), o aumento de veículos tende a estabilizar, mas o mesmo não acontece em países como a Índia ou China que ainda se encontram longe do seu máximo potencial.

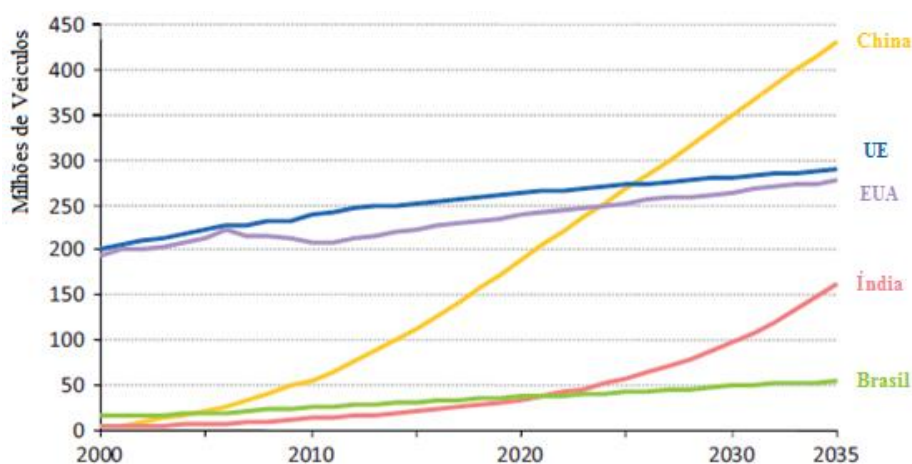


Figura 2 - Projeção de crescimento do número de veículos ligeiros. (IEA 2012c)

A UE importa cerca de 50% da energia que consome, o que é considerado como uma forte dependência energética do exterior (Ramalho 2013). À medida que se instala e aumenta a instabilidade política e social nos principais países produtores de petróleo o argumento da dependência da importação ganha importância, especialmente para este recurso.

De forma a fazer face a este problema, a UE estabeleceu através da Diretiva 2009/28/CE, transposta para a legislação portuguesa através do Decreto-lei nº117/2010, a promoção da produção e da utilização de biocombustíveis e de outros combustíveis renováveis no espaço comunitário, no âmbito do desenvolvimento sustentável da redução da dependência das importações de energia. É também uma forma de influenciar o mercado dos combustíveis no setor dos transportes e, deste modo, tentar aumentar a segurança do abastecimento energético a médio e longo prazo (Ramalho 2013).

O aumento da procura por combustíveis fósseis associado à depleção das suas reservas bem como à incerteza da sua disponibilidade a longo prazo leva à especulação e aumento dos preços de refinação e venda. Este efeito associado aos problemas de qualidade do ar que se têm vindo a revelar nas grandes metrópoles tem levado a um aumento significativo na investigação e desenvolvimento (I&D) de novas formas de energias renováveis e limpas, que poderão trazer reais benefícios no que diz respeito à mitigação de gases de efeito estufa (GEE) e principalmente na mitigação da tão famigerada dependência energética.

1.2. Biocombustíveis

A produção de biocombustíveis assume especial relevância na redução das emissões de GEE e no aumento da diversificação da origem da energia primária. Esta diversificação reduz a dependência externa em relação a produtos petrolíferos e, conseqüentemente, a dependência económica, já que esta tem como base o setor energético.

O consumo de biocombustíveis é livre de GEE pois o seu princípio assenta na base de que todo o dióxido de carbono (CO_2) emitido pela combustão foi previamente sequestrado no crescimento da matéria-prima, ou seja, o consumo de biocombustíveis pode ser integrado no ciclo do carbono (Chisti 2007; Keyzer *et al.* 2008).

De ressaltar que o facto de o consumo de biocombustíveis ter uma pegada de carbono inexistente não torna esta tecnologia uma tecnologia limpa, ou livre de consequências ambientais negativas, pois apenas o consumo de biocombustíveis pode ser visto numa ótica de poupança de GEE quando comparado com o consumo de combustíveis fósseis. Quando é introduzido o conceito de análise de ciclo de vida (ACV) são evidentes consequências e *outputs* negativos inexoravelmente associados à sua produção (Naik *et al.* 2010).

Atualmente os biocombustíveis apresentam-se como o principal substituto dos combustíveis fósseis, principalmente no setor dos transportes, cuja força motriz carece de alternativas capazes de enfrentar simultaneamente os problemas ambientais e o aumento da procura (Carvalho *et al.* 2006; Chisti 2007; Chisti 2008; Keyzer *et al.* 2008). Esta afirmação assenta em duas grandes constatações:

1. As alterações tecnológicas e logísticas necessárias para a substituição em grande escala de combustíveis fósseis por biocombustíveis são bastante pequenas, pois todo o processo

desde a tecnologia de produção até à tecnologia de consumo passando pela distribuição já se encontra implementado (Naik *et al.* 2010; Ramalho 2013).

2. Ambos os processos de produção, nomeadamente a fermentação e a transesterificação, já se encontram amplamente aperfeiçoados e são utilizados em escala industrial (Keyzer *et al.* 2008).

Dos biocombustíveis produzidos atualmente, o biodiesel e o bioetanol são os dois principais combustíveis renováveis que mais têm chamado à atenção (Chisti 2007), sendo o primeiro o substituto direto do *diesel* e o bioetanol o substituto da gasolina. Estes podem ser divididos em biocombustíveis de primeira e segunda geração. A principal diferença entre os biocombustíveis de primeira e segunda geração encontra-se na origem da matéria-prima e, conseqüentemente, algumas diferenças no processo de obtenção do produto final.

1.3. Biocombustíveis de primeira geração

Nos biocombustíveis de primeira geração, a matéria-prima provém, principalmente, de culturas alimentares. É utilizado o processo de fermentação da cana-de-açúcar, milho, entre outras, se o objetivo for a produção de bioetanol. Se a matéria-prima for proveniente de culturas oleaginosas é aplicado o processo de transesterificação (o mais utilizado industrialmente) para a obtenção de biodiesel, caso dos óleos de palma, girassol, amendoim, entre outras culturas oleaginosas.

Os biocombustíveis de primeira geração podem trazer alguns benefícios em termos de emissões de CO₂ e sem dúvida que contribuem para o aumento da segurança energética de cada país. Contudo, existem sérias preocupações acerca do fornecimento e origem da matéria-prima e as suas conseqüências, criando algum ceticismo por parte da comunidade científica, nomeadamente, pressões no uso do solo, perda de biodiversidade, competição com o setor alimentar, balanços de carbono e consumo de recursos hídricos (Naik *et al.* 2010; Miranda 2011; Franco *et al.* 2013; Ramalho 2013).

Estes fatores acabam por impor limites na produção de combustíveis de primeira geração, que hoje em dia já atinge os cerca de 50 mil milhões de litros por ano, com as conseqüências que daí advêm (Naik *et al.* 2010).

Assim sendo, para que haja uma real melhoria no desempenho ambiental e económico, é aconselhável que se usem novas alternativas mais eficientes baseadas tanto em matérias-primas renováveis, como no uso e desenvolvimento de novas tecnologias (Naik *et al.* 2010).

1.4. Biocombustíveis de segunda geração

Os biocombustíveis de segunda geração surgiram para fazer face a algumas das desvantagens dos biocombustíveis de primeira geração, isto porque usam matéria-prima não alimentar, que pode ser considerada como resíduo, ou proveniente de solos menos bons para a agricultura, não competindo assim com o setor alimentar. A matéria-prima destes combustíveis é essencialmente biomassa lenhocelulósica.

Segundo Miranda (2011), a designação de biomassa lenhocelulósica inclui: madeiras e ervas, resíduos de indústrias agropecuárias e serrações, resíduos sólidos urbanos, nomeadamente, resíduos alimentares vegetais, relva e papel usado.

Nos dias de hoje, os biocombustíveis de segunda geração, ainda, têm um custo de produção muito acima daquele que pode ser praticado para o consumidor comum, isto deve-se, principalmente, a algumas barreiras tecnológicas que precisam de ser ultrapassadas para que seja atingido o seu máximo potencial (Naik *et al.* 2010).

1.5. Investigação e desenvolvimento

Tanto os biocombustíveis de primeira e segunda geração têm sofrido de algum ceticismo por parte da comunidade científica, principalmente, na última década. Parte deste ceticismo advém de alguns problemas tanto na obtenção da matéria-prima, como também nos impactes diretos e indiretos que provocam no meio ambiente.

Pelas razões referidas anteriormente, o investimento em I&D é crucial para suprimir os *deficits* ambientais e tecnológicos inerentes ao processo de produção de biocombustíveis. O investimento em I&D no campo da energia oscila consoante muitos fatores, desde acordos internacionais que procuram promover o seu aumento, até a pressões negativas provenientes dos grandes cartéis económico-financeiros, passando pelas flutuações normais dos mercados.

Na figura 3 podemos verificar como varia o investimento nos vários setores energéticos consoante a conjuntura da altura. Em 2009 temos um aumento abrupto do investimento no setor dos combustíveis fósseis, energias renováveis e eficiência energética. Este investimento surge depois de se ter atingido o record do preço do barril de petróleo em 2008, que veio agravar uma crise económica mundial já instalada e também despertar alguns receios acerca da dependência energética.

O progressivo desinvestimento em energia nuclear deve-se, principalmente, à opinião pública devido aos riscos associados a um acidente nuclear de grandes proporções, agravada pelo recente acidente em Fukushima no Japão, em março de 2011, que tem potencial para se tornar numa das maiores catástrofes ambientais da história do nosso planeta, onde a contaminação por radiação se está a alastrar por todo o oceano Pacífico, tendo já sido reportado a presença na Califórnia de alguns

radioisótopos transportados por atuns (Madigan *et al.* 2012). Este incidente levou a que alguns governos alterassem o seu programa nuclear, nomeadamente, a Alemanha. A Chanceler Alemã Angela Merkel tomou a decisão de fechar todos os reatores nucleares até 2022, tornando a Alemanha, a partir dessa data, a única potência mundial sem energia nuclear (Diário Económico 2011).

No que diz respeito ao investimento em outros tipos de energia, de referir o ano de 2010 onde o aumento do investimento ocorreu sobretudo devido aos novos desenvolvimentos nas células de hidrogénio e armazenamento de energia que têm conhecido alguns avanços nos últimos anos.

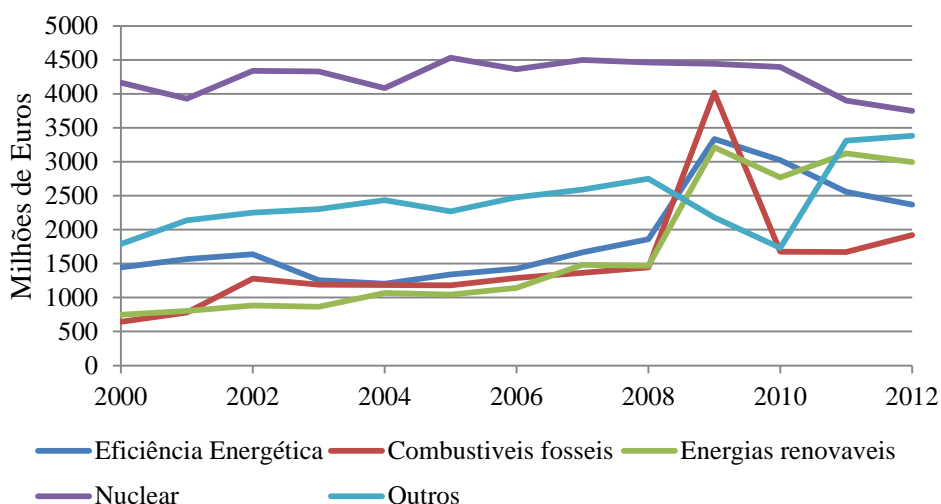


Figura 3 – Investimento mundial em milhões de euros no setor da energia (adaptado de IEA 2012a).

A imprevisibilidade de ocorrência de fatores que tenham grande influência na conjuntura, associada à fraca estabilidade dos mercados e a acordos internacionais, leva a que o desempenho ambiental e os aspetos técnico-económicos sejam cada vez mais tomados em conta na I&D de novos processos, tendo em vista a segurança energética e a proteção ambiental, cruzando diversas áreas desde a engenharia civil até à engenharia genética, de forma a tirar o máximo potencial do investimento realizado.

1.6. Microalgas

As microalgas são organismos aquáticos unicelulares fotossintéticos. A sua base de crescimento e reprodução consiste, no consumo de carbono, macro e micronutrientes e luz solar. O seu metabolismo pode ser autotrófico, heterotrófico ou mixotrófico e o facto de serem organismos unicelulares confere-lhes uma maior eficiência na conversão da energia solar em energia química (Schenk *et al.* 2008; Amaro *et al.* 2011).

As microalgas possuem uma ampla diversidade bioquímica, sendo a base de muitas aplicações biotecnológicas e industriais. Despertam mais interesse no setor da nutrição, indústria farmacêutica e

cosmética, mas também, em aplicações ambientais, como por exemplo o tratamento de águas residuais, a fixação de CO₂ e a produção de biocombustíveis (bioetanol e biodiesel) (Ramalho 2013).

Desde as primeiras culturas industriais nos anos 60 do século passado no Japão, onde era usada a espécie *Chlorella vulgaris*, apenas algumas espécies têm sido cultivadas de forma industrial, como *Spirulina* sp. e *Scenedesmus* sp para a produção de comida e síntese de ficocianina (pigmento azul utilizado na alimentação e cosmética), *Haematococcus pluvialis* para a produção de astaxantina (carotenoide utilizado para nutrição) e *Dunaliella* salina para a produção de β -caroteno (carotenoide utilizado para nutrição) (Carvalho *et al.* 2006).

Atualmente as empresas que fazem cultura industrial de microalgas ainda não se encontram em fase de produção de biocombustíveis, contudo começam a direcionar a sua I&D nesse sentido, tentando melhorar a viabilidade económica e integrar a produção num contexto de biorefinação, usando os produtos de alto valor acrescentado para balancear os custos de produção.

A empresa *Earthrise Nutritionals* é aquela que possui a maior lagoa fotossintética, ocupando uma área de 440 km² (Figura 4) e a empresa *Hainan Simai* sediada na província de Hainan, China, é aquela que possui maior produção, conseguindo produzir 200 toneladas anuais de biomassa, o que representa quase 10% da produção mundial (Spolaore *et al.* 2006). Ambas as empresas estão direcionadas para produtos de valor acrescentado, nomeadamente indústria química, cosmética e nutricional. Em Portugal, situada no Parque Natural da Ria Formosa no Algarve, encontra-se a *Necton*. É a empresa com maior experiência em produção contínua de microalgas em fotobiorreactores a nível europeu, estando direcionada para a indústria nutricional e cosmética. É reconhecida como líder na Europa em biotecnologia aplicada as microalgas estando associada ao mais recente programa INTESUSAL (Integrated Sustainable Algae) que tem como objetivo gerar biocombustível a partir de microalgas de uma forma industrial e sustentável (INTESUSAL 2014; Necton 2014).



Figura 4 - Lagoas fotossintéticas de alta carga da *Earthrise Nutritionals*, em Califórnia, E.U.A. (Mostafa 2012)

Embora atualmente ainda não seja realizada a cultura industrial de microalgas direcionada para a produção de biocombustíveis, estas surgem, no atual panorama energético e ambiental, como a única matéria-prima capaz de assegurar a produção de biocombustíveis de forma sustentável (Chisti 2007).

Esta afirmação assenta nas características particulares das microalgas:

- Elevada eficiência no armazenamento de energia solar, através da produção de compostos orgânicos via fotossíntese.
- Algumas espécies são ricas em frações lipídicas, com capacidade de serem melhoradas quando cultivadas em ambientes controlados.
- Utilizam nutrientes como azoto e fósforo para o seu crescimento. Estes podem ser obtidos de diversas fontes, como por exemplo efluentes agrícolas, industriais ou municipais. Esta opção conjuga a poupança na adição de nutrientes com o tratamento de águas residuais e biorremediação (Hu *et al.* 2008; Feng *et al.* 2011; Yang *et al.* 2011; Wu *et al.* 2012).
- Podem crescer em sistemas de cultura abertos (lagoas fotossintéticas de alta carga) ou em sistemas fechados (fotobiorreactores).
- Os sistemas de cultura de microalgas podem ser instalados em terrenos impróprios para a agricultura convencional, utilizando terras e recursos de baixo custo de oportunidade.
- A sua produção não compete com o setor alimentar.
- Taxa de sequestro de carbono mais elevada do que nas culturas de oleaginosas, podendo realizar-se a simbiose com indústrias emissoras.
- Produção contínua, podendo sofrer oscilações sazonais no caso dos sistemas de cultura abertos.
- Possibilidade de serem integradas num conceito de biorefinaria, tendo em vista melhorar o desempenho económico e ambiental (Chisti 2007; Naik *et al.* 2010).

Todos os fatores, irrefutavelmente positivos referidos anteriormente, despertaram uma onda de interesse e investimento na maturação de algumas tecnologias antigas e, também, na pesquisa de novas tecnologias que permitam melhorar o desempenho ambiental e económico desta renovada oportunidade no setor das energias renováveis.

1.7. Objetivos da presente dissertação

A presente dissertação tem como principal objetivo uma revisão bibliográfica, de dados publicados em bibliografia científica, acerca de biocombustíveis e microalgas como matéria-prima para a produção dos mesmos. De entre a multiplicidade de artigos publicados foram selecionados os

referentes às Análises Ciclo-de-Vida (ACV), trabalhos laboratoriais específicos e principalmente trabalhos de investigação.

A revisão bibliográfica baseou-se em critérios bem definidos e sempre que possível efetuou-se uma avaliação qualitativa e quantitativa dos dados obtidos nas publicações científicas selecionadas.

Através dos dados obtidos, foi elaborada uma síntese geral das tecnologias existentes para a produção de biocombustíveis, focando em particular o biodiesel microalgal, tentando identificar quais as melhores tecnologias de momento, e sugerir qual o caminho que deve ser tomado, para tornar económica e ambientalmente viável a produção de biocombustíveis a partir de microalgas.

Para além disso, foi efetuada uma previsão da possível produção de biodiesel a partir de microalgas cultivadas em águas residuais, e a sua contribuição para as metas de incorporação da UE, e a possível mitigação de GEE que podem trazer.

1.8.Estrutura da dissertação

A presente dissertação de mestrado está dividida em sete capítulos e apresenta a seguinte estrutura:

Capítulo 1 – Nesta capítulo é efetuada a introdução à presente dissertação de mestrado e onde são apresentados os objetivos da mesma.

Capítulo 2 – Neste capítulo é apresentada a metodologia aplicada para a realização da pesquisa bibliográfica.

Capítulo 3 – Neste capítulo são apresentadas algumas das dificuldades e restrições dos estudos encontrados.

Capítulo 4 – Neste capítulo, é efetuada a revisão bibliográfica, onde se fez uma ligeira análise dos biocombustíveis de primeira e segunda geração em comparação com o biodiesel proveniente de microalgas. Foram identificadas as etapas de produção e as tecnologias emergentes referentes a cada etapa.

Capítulo 5 – Neste capítulo é apresentado o modelo com o qual foi feita uma previsão do biodiesel produzido a partir de microalgas cultivadas em águas residuais e a mitigação de GEE. São também apresentados os resultados obtidos.

Capítulo 6 – Neste capítulo são apresentadas as conclusões e sugestões de trabalho futuro.

2. METODOLOGIA

De forma a atingir os objetivos propostos, foi necessário calcular a produção primária da microalga *Scenedesmus obliquus*, tendo-se utilizado o modelo proposto por Ruiz *et al.* (2013), que utiliza a equação de Verhulst e Pearl (Gause 1934) adaptada ao balanço de massas de um reator em contínuo. Segundo o modelo, a produção primária depende da taxa de crescimento e da concentração máxima, os valores admitidos foram obtidos a partir de culturas em águas residuais. A dedução do modelo é apresentada no quinto capítulo da presente dissertação

Para além dos dados necessários para se obter a produção primária, nomeadamente taxa de crescimento e concentração máxima da biomassa algal, foi necessária a pesquisa das tecnologias de produção e a sua eficiência. Estas foram analisadas tanto do ponto de vista económico, como também do ponto de vista ambiental.

Foi também calculada a possível mitigação de emissão de GEE de uma estação de tratamento de águas residuais proporcionada pela cultura de microalgas. Para se atingir este objetivo foi calculado o carbono necessário para atingir determinadas produtividades volumétricas, modelo proposto por Arudchelvam e Nirmalakhandan (2013). A este valor foi deduzido o carbono emitido pela energia utilizada no processo de produção. As emissões de carbono provenientes da energia consumida foram calculadas, através de um fator de emissão proposto pela Agência Portuguesa do Ambiente (APA).

De forma a compreender todo o processo de produção de biodiesel a partir de microalgas foi efectuada uma pesquisa bibliográfica direccionada para os objectivos. A pesquisa bibliográfica baseou-se em publicações científicas e as condições de pesquisa e palavras-chave são apresentadas de seguida:

- Data da publicação: 2004 até ao presente.
- Idioma: Inglês.
- Palavras-chave:
 - Biodiesel
 - Biofuels
 - Extraction
 - Flat-Plate
 - Flocculation
 - Harvesting
 - Hexane
 - HTL
 - Hydrothermal liquefaction
 - LCA
 - Lipids

- Life Cycle Assessment
 - Microalgae
 - Open ponds
 - Photobioreactors
 - Production
 - Productivity
 - Review
 - State of the art
 - Supercritical CO₂
 - Supercritical Methanol
 - Transesterification
 - Tubular photobioreactor
 - Treatment
 - Wastewater
 - Water
- Diversas combinações das palavras-chave.
- O processo de pesquisa é um processo dinâmico, e por isso, sempre que se achou necessário, foi efetuada a pesquisa bibliográfica para além da data de publicação referida (2004).

3. PRINCIPAIS LIMITAÇÕES DOS ESTUDOS CONSULTADOS

As principais limitações relacionadas com os estudos consultados são:

- A especificidade de cada estudo. Na maioria dos casos, os estudos diferem na espécie de microalga utilizada, metabolismos, métodos de cultura e nas condições de operação da biomassa produzida.
- Os limites são inconsistentes de estudo para estudo, bem como as unidades funcionais e metodologias de alocação.
- A maioria dos estudos é baseada em resultados experimentais e em formas de cultura descontínua que são difíceis de extrapolar para grandes instalações industriais e em contínuo.
- Os pressupostos admitidos em cada estudo também tornam difícil a sua comparação e apreciação.

4. Revisão bibliográfica

4.1. A ineficiência e impactes dos biocombustíveis de primeira e segunda geração

A incapacidade de afirmação dos biocombustíveis de primeira e segunda geração assenta em cinco principais razões que são descritas de seguida:

4.1.1. Eficiência

A produtividade das oleaginosas terrestres leva a que sejam necessárias grandes plantações para conseguir suprimir apenas parte da procura por combustível.

Usando os Estados Unidos da América como cenário, a tabela 2 apresenta a quantidade de óleo produzido por várias culturas e a área necessária para atingir 50% das necessidades energéticas do setor dos transportes. Como é possível observar, em todos os casos a área existente é substancialmente inferior à área necessária.

Tabela 2 - Comparação de fontes de biodiesel (adaptado de Chisti 2007 e Gouveia e Oliveira 2009).

Cultura	Quantidade de óleo (L/ha)	Área necessária (M ha)	Área existente (M ha)
Milho	172	1540	846
Soja	446	594	326
Canola	1190	223	122
Coco	2689	99	54
Palma	5950	45	24

Em todos os países à exceção do Brasil, onde a cultura de cana-de-açúcar é feita nas condições mais favoráveis possíveis (regadio, uso de fertilizantes e excelentes condições meteorológicas) e é favorecida por altos subsídios do Estado, a produção de biocombustível está longe de ser rentável. Assenta em subsídios e em quantidades mínimas de produção o que torna os preços dos biocombustíveis altamente inelástico (Keyzer *et al.* 2008).

4.1.2. Competição com o setor alimentar

A produção de biocombustíveis de primeira geração, aqueles que são provenientes de culturas alimentares, acabam inevitavelmente por oferecer competição com o setor alimentar, contribuindo para a inflação e especulação dos preços dos produtos alimentares (Schnoor 2006; Chisti 2007; Feng *et al.* 2011; Franco *et al.* 2013).

Este assunto tem sido bastante debatido nos últimos anos e diversos estudos já foram realizados (Keyzer *et al.* 2008; Hochman *et al.* 2012). Estes parecem indicar que a variação dos preços dos biocombustíveis não afeta diretamente o preço dos bens alimentares. O mesmo não acontece com a introdução dos biocombustíveis no mercado de bens alimentares transacionáveis. Hochman *et al.* (2012) mostraram que de 2001 a 2011 o preço do milho aumentou em 150%. Os biocombustíveis contribuíram para este aumento com cerca de 23% e o crescimento económico contribuiu com mais de 50%.

Contudo, existem autores que não responsabilizam os biocombustíveis pelo aumento do preço dos produtos alimentares, como é o caso do estudo realizado por Armah *et al.* (2009) que descrevem a economia associada à produção de alimentos, apontam o aumento do preço do petróleo, aumento dos salários e custos de transporte como os principais fatores que contribuem para o aumento do preço dos produtos alimentares.

Apesar dos estudos divergirem neste aspeto, a maioria da literatura aponta no sentido de que os biocombustíveis de primeira geração acabam por ter uma influência mais ou menos direta no preço final de alguns alimentos, criando alguma pressão nos mercados (Keyzer *et al.* 2008).

Esta pressão foi atenuada com a entrada dos biocombustíveis de segunda geração, cuja matéria-prima provém de biomassa lenhocelulósica. Esta não concorre com usos alimentares e é obtida de terrenos menos bons para agricultura, o que não erradica os problemas associados ao uso do solo, agroquímicos e pegada da água (Miranda, 2011). Contudo o progresso neste campo mostrou-se surpreendentemente lento e os principais entraves prendem-se com a dificuldade de acesso à celulose.

Devido à sua complexidade molecular, a biomassa lenhocelulósica precisa sofrer alguns tratamentos para conversão e extração dos açúcares que posteriormente serão fermentados (tal como no etanol de primeira geração). Nomeadamente, a presença de lenhina forma compostos recalcitrantes que dificultam o acesso à celulose, pelo que a biomassa tem de ser sujeita a fortes pré-tratamentos que acabam por reduzir o rendimento da operação, principalmente quando se aumenta a escala do processo (Keyzer *et al.* 2008; Miranda 2011).

4.1.3. Pegada da água

Atualmente, embora a importância estratégica dos recursos hidrológicos seja reconhecida mundialmente e a sua sustentabilidade faça parte de quase todas as agendas científicas, sociais e políticas, este recurso continua a ser qualitativa e quantitativamente ameaçado.

A poluição associada à industrialização e ao rápido crescimento económico impõem sérios riscos à disponibilidade e qualidade deste recurso de primeira necessidade (Abdel-Raouf *et al.* 2012).

Harto *et al.* (2010) compilaram dados de alguns autores (Tabela 3) de forma a obter uma perspetiva da pegada da água de vários tipos de biocombustíveis de primeira e segunda geração. Como é possível verificarmos, os autores chegaram à conclusão que o biodiesel de soja possui uma pegada da água inferior quando comparado com o bioetanol tanto de primeira como de segunda geração. Também podemos verificar que o facto de o etanol ser de segunda geração, não traz vantagens na redução da pegada da água.

Tabela 3 - Pegada da água das varias fases do ciclo de produção de biocombustíveis (litros de água consumidos por cada litro de combustível produzido), (adaptado de Harto *et al.* 2010).

Fases do processo	Etanol (1ª geração)	Biodiesel de soja	Etanol (2ª geração)
Irrigação	403	286	411
Fertilizantes	6,5	30	3,4
Construção da estação de processamento	0,18	0,06	0,18
Produção	11	1	6
Distribuição e marketing	2,7	2,7	2,7
Total	423,38	319,76	423,28

4.1.4. Perda de biodiversidade e desertificação

O aumento da produção de biocombustíveis, principalmente devido a subsídios dos estados, já desencadeou mudanças globais no uso do solo, ameaçando a biodiversidade (Keyzer *et al.* 2008). Um caso flagrante é o da ilha do Bornéu, onde milhares de hectares de floresta tropical foram queimados para desbravar terrenos para a cultura de óleo de palma, destruindo assim o habitat de centenas de espécies levando algumas delas a risco de extinção. Este flagelo é patrocinado por um dos maiores grupos económicos do mundo, a Unilever (White 2008).

Este tipo de problemas leva a que se proponham novos e mais rigorosos critérios de sustentabilidade, de certificação ambiental, e principalmente que estes tenham mais peso nas tomadas

de decisão, quer da parte do produtor quer da parte do consumidor (Reinhardt *et al.* 2007; WWI 2006; Keyzer *et al.* 2008).

4.1.5. Balanços de carbono negativos

As culturas para biocombustível dependem da utilização de fertilizantes azotados, o que leva a um aumento das emissões de óxido nitroso (N₂O) para a atmosfera, um gás com um efeito estufa superior ao CO₂. Em adição a este fator as queimadas feitas para limpar terrenos para novas plantações podem levar a um aumento ainda maior das emissões de CO₂. Se conjugarmos estes dois fatores quase que anulamos a poupança de emissão de GEE (Keyzer *et al.* 2008).

Apesar da grande quantidade de estudos, devido às diferentes fronteiras e variáveis utilizadas nesses mesmos estudos, não sabemos até que ponto a utilização de biocombustíveis é realmente benéfica para o ambiente. Apesar de parecerem claras as vantagens da substituição direta de combustíveis fósseis por biocombustíveis, a grande quantidade de *inputs* de origem fóssil que são necessários para a produção e os *outputs* resultantes de todo o processo, podem pôr em cheque os supostos benefícios ambientais que advêm desta substituição (Chisti 2007; Keyzer *et al.* 2008; Franco *et al.* 2013).

Pelas cinco razões referidas anteriormente, podemos concluir que a ideia de contarmos com o setor primário como uma grande fonte de energia para o setor energético ou dos transportes não só é errada como também insustentável do ponto de vista ambiental, económico e humanitário.

Assim o desenvolvimento tecnológico tem sido redirecionado para matérias-primas que possuam maior eficiência energética e ambiental, e que não concorram com usos não energéticos (Franco *et al.* 2013). As microalgas surgem como uma possível solução, levando vantagem sobre os seus concorrentes diretos sendo consideradas como a principal matéria-prima de biocombustível de terceira geração (Sheehan *et al.* 1998; Chisti 2007; Tang *et al.* 2011).

4.2. Biodiesel

O termo biodiesel foi utilizado pela primeira vez em 1988, num estudo realizado por Wang (1988). Contudo, a ideia de se usar óleo vegetal no lugar de *diesel* comum não é de todo recente e remonta ao primeiro ano do início do século passado (Songstad *et al.* 2009).

Segundo Songstad *et al.* (2009) a primeira utilização de biodiesel remonta à Exposição Mundial de 1900, realizada em Paris. Segundo Rudolf Diesel (Knothe 2001), a Otto Company apresentou, a pedido do governo francês, um motor a *diesel* cujo combustível era proveniente de óleo de amendoim.

Este motor estava desenhado para usar óleo mineral, mas funcionou a óleo vegetal igualmente bem sem que qualquer alteração lhe tenha sido efetuada (Knothe 2001; Songstad *et al.* 2009).

Segundo Knothe (2001), Rudolf Diesel relaciona o pedido do governo francês para que o motor funcione a óleo de amendoim com a abundância nas suas colónias africanas e facilidade de plantação. Desta forma as colónias poderiam suprimir as suas necessidades energéticas a partir dos seus próprios recursos, sem necessidade de importar carvão ou combustível líquido.

Porém, e apesar de terem sido utilizados diversos óleos para além do de amendoim, o facto de à altura o barril de petróleo ser incrivelmente barato e a sua refinação, simples e barata levou a que os óleos vegetais fossem substituídos por crude refinado. Segundo Knothe (2001) durante as décadas de 30 e 40 do século XX estes apenas eram utilizados como último recurso e como emergência. Songstad *et al.* (2009) referem que desde a década de 50 o interesse em converter óleo vegetal em biodiesel tem sido guiado não pela escassez de crude ou problemas ambientais mas sim por fatores económicos e geográficos.

O biodiesel é constituído por ésteres metílicos de ácidos gordos (*Fatty Acid Methyl Ester* - FAME) que podem ser obtidos através de vários processos envolvendo a transformação do conteúdo lipídico presente no óleo. Os óleos mais utilizados atualmente para a produção de biodiesel são os de palma, soja, colza e girassol. A aplicação direta destes óleos está limitada por algumas características dos motores, mas principalmente devido às propriedades físicas dos óleos; (nomeadamente, a alta viscosidade, pouca volatilidade e caráter poli-insaturado). O caráter poli-insaturado dos óleos provoca uma combustão incompleta e consequentemente leva à criação de depósitos no interior do motor. Só a partir do final da década de 70 do século passado, onde foi renovado o interesse por este tipo de combustíveis, derivado do embargo promovido pela Organização de Países Exportadores de Petróleo (OPEP), é que começaram a surgir investigações e soluções para o problema da alta viscosidade dos óleos vegetais (Knothe, 2001).

Segundo Franco *et al.* (2013) e Knothe (2001) o biodiesel pode ser obtido através de pirólise, transesterificação, esterificação, hidroesterificação e extração do óleo e transesterificação numa única etapa, denominada de transesterificação direta ou *in situ*. Estes processos podem ser conduzidos ainda com a aplicação de ultrassons e micro-ondas. Estes processos não são limitantes quanto à proveniência do óleo. Aparentemente pode ser utilizado qualquer tipo de óleo vegetal ou animal sem que haja grandes alterações no produto final (Knothe 2001).

4.3. Microalgas como matéria-prima para a produção de biodiesel

As microalgas, ao contrário das plantas oleicas, têm um crescimento extremamente rápido, podendo duplicar a sua biomassa em menos de 24 horas (Chisti 2007) devido, principalmente à sua elevada eficiência fotossintética.

Salvo raras exceções, a eficiência fotossintética das plantas terrestres situa-se na ordem dos 0,1-0,2% (Franco *et al.* 2013), por outro lado, nas microalgas é comum encontrarmos eficiências fotossintéticas entre os 4-7%, o que no final representa uma produtividade maior em conteúdo oleico por unidade de área como podemos comprovar pela tabela 4.

Tabela 4 – Produtividade primária e eficiência fotossintética de algumas culturas de plantas terrestres e microalgas (adaptado de Franco *et al.* 2013).

Fonte de biomassa	Tipo de combustível	Produtividade primária (bep.ha ⁻¹ .ano ⁻¹)	Eficiência fotossintética (%)
Milho	Etanol	20	0,2
Cana-de-açúcar	Etanol	210-250	2-3
Soja	Biodiesel	13-22	0,1-0,2
Girassol	Biodiesel	8,7-16	0,1-0,2
Microalgas	Biodiesel	390-700	4-7

As microalgas podem produzir vários tipos de conteúdos lipídicos, nomeadamente fosfolípidos, glicolípidos, mono-, di- e triacilgliceróis. A sua quantidade e distribuição dependem do tipo de microalga e das condições de cultura (Hu *et al.* 2008; Franco *et al.* 2013).

De entre os tipos de lípidos produzidos apenas os mono-, di- e triacilgliceróis são facilmente convertidos em biodiesel pelo processo de transesterificação (Franco *et al.* 2013).

A tabela 5 apresenta uma compilação de estudos realizada por Amaro *et al.* (2011) sobre a produtividade primária e a quantidade de óleo (peso seco) produzida por algumas espécies de microalgas, onde podemos observar a grande variabilidade na sua produção lipídica.

A gama de intervalos que podemos observar, tanto do conteúdo lipídico como da produtividade deve-se principalmente à grande quantidade de variáveis existentes no seu cultivo, nomeadamente, meios de cultura, metabolismos diferentes, intensidade luminosa e escolha de bioreactor.

Assim sendo, é necessária uma escolha criteriosa da microalga a utilizar bem como em que condição será cultivada, tendo em vista maximizar a produtividade primária e produção de lípidos.

Tabela 5 - Produtividade primária e conteúdo lipídico de algumas espécies de microalgas (adaptado de Amaro *et al.* 2011).

Meio aquático	Microalga	Conteúdo em Lípidos (%)	Produção de lípidos (mg.L ⁻¹ .d ⁻¹)
Água Doce	<i>Botryococcus</i> sp.	25,0-75,0	-
	<i>Chaetoceros muelleri</i>	33,6	21,8
	<i>Chlorella emersonii</i>	25,0-63,0	10,3-50,0
	<i>Chlorella protothecoides</i>	14,6-57,8	1214
	<i>Chlorella sorokiniana</i>	19,0-22,0	44,7
	<i>Chlorella vulgaris</i>	5,0-58,0	11,2-40,0
	<i>Chlorococcum</i> sp.	19,3	53,7
	<i>Ellipsoidion</i> sp.	27,4	47,3
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	11,0-55,0	-
	<i>Scenedesmus</i> sp.	19,6-2,1	40,8-53,9
Água Salgada	<i>Dunaliella salina</i>	6,0-25,0	116,0
	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	16,7-71,0	-
	<i>Dunaliella</i> sp.	17,5-67,0	33,5
	<i>Nannochloris</i> sp.	20,0-56,0	60,9-76,5
	<i>Nannochloropsis oculata</i>	22,7-29,7	84,0-142,0
	<i>Neochloris oleoabundans</i>	29,0-65,0	90,0-134,0
	<i>Pavlova salina</i>	30,9	49,4
	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	18,0-57,0	44,8

De forma a conciliar algumas das vantagens proporcionadas por determinadas espécies de microalgas, Chisti (2008) propôs um modelo (Figura 5) de forma a tirar o máximo rendimento da produção de biodiesel ou bioetanol a partir de microalgas.

Este modelo concilia a recirculação do meio de cultura após colheita da biomassa e o aproveitamento da mesma num conceito de biorefinaria onde, pós-processamento do biocombustível os resíduos são utilizados para outras indústrias (Spolaore *et al.* 2006).

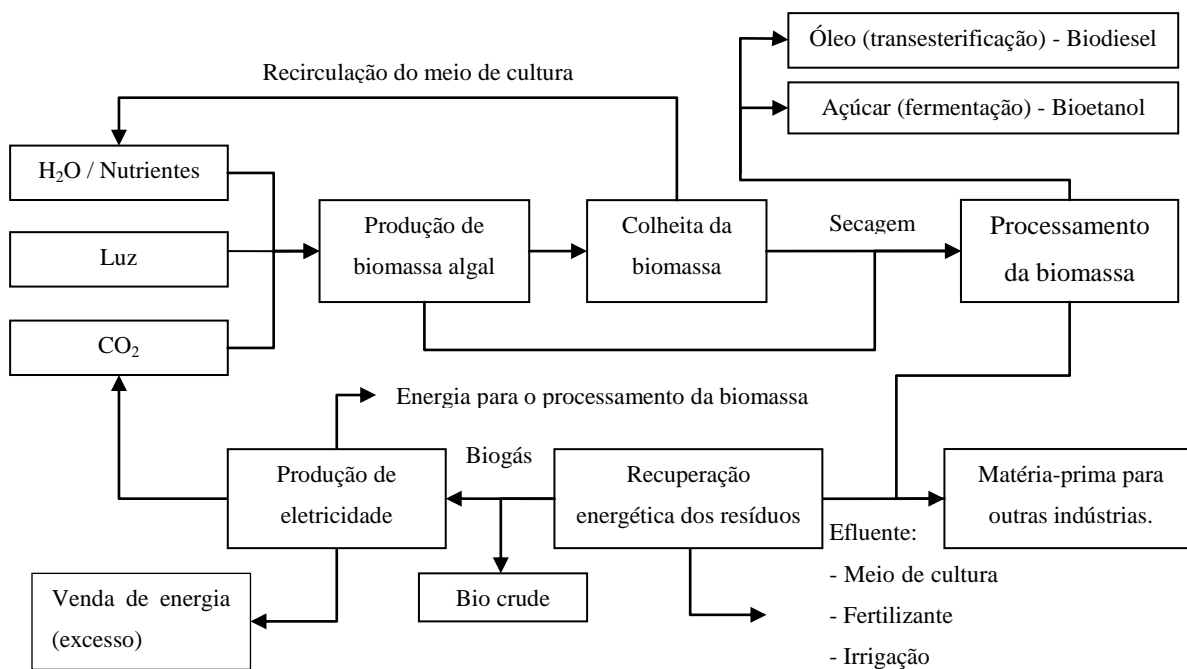


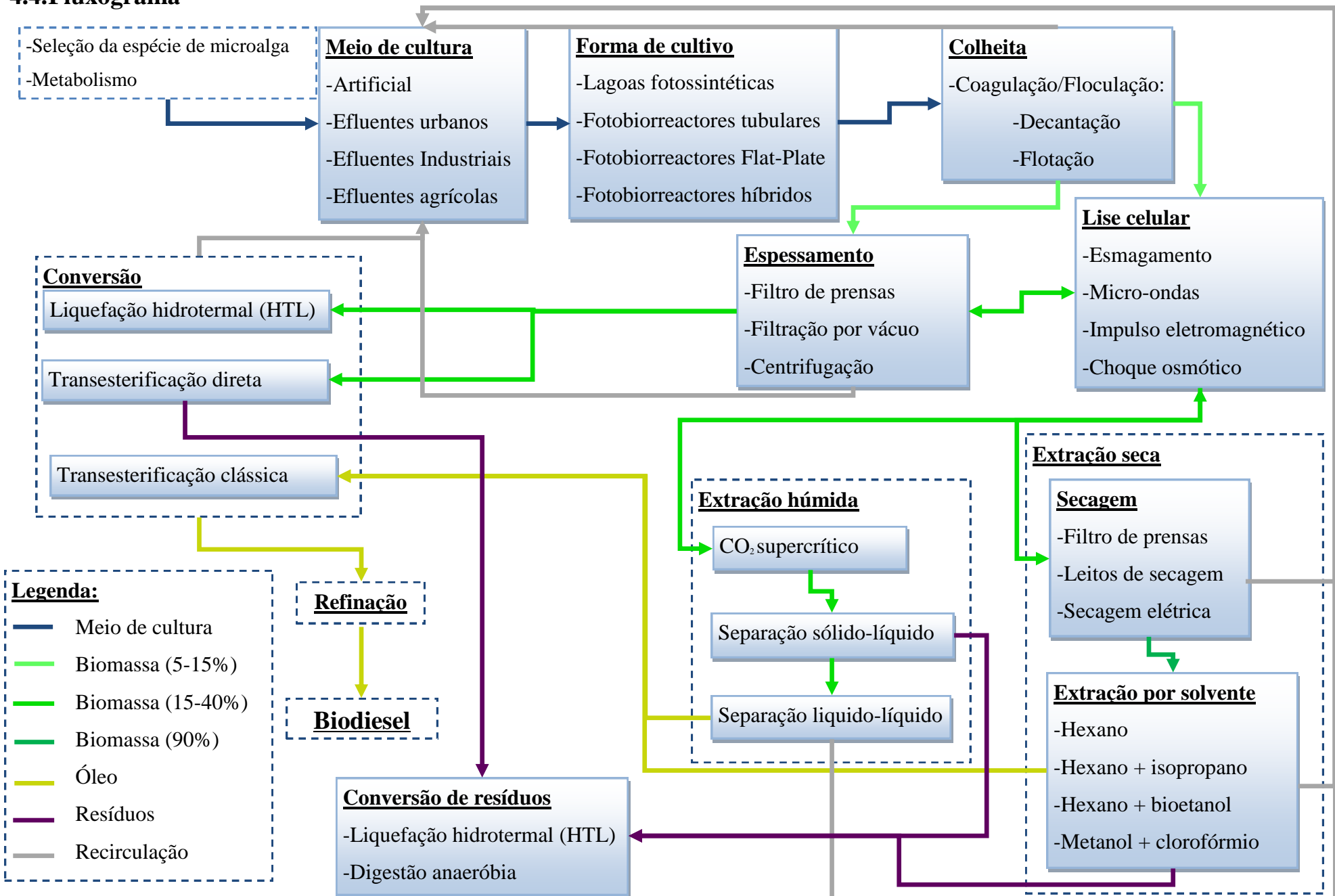
Figura 5 - Fluxograma conceitual do ciclo de vida da produção de biocombustível a partir de microalgas. (adaptado de Chisti 2008)

Ainda de referir a possibilidade de utilização de águas residuais como principal fonte de nutrientes, a possibilidade de se proceder à geração de eletricidade que poderá ser injetada no próprio sistema ou vendida, e ainda o aproveitamento de CO₂ proveniente de outras indústrias.

Estes princípios têm como principal objetivo melhorar o desempenho do ponto de vista energético e ambiental, caracterizando aquilo que tem sido denominado pela comunidade internacional de *ecodesign* (Franco *et al.* 2013).

Como podemos verificar na figura 5, a produção de biocombustíveis a partir de microalgas envolve várias etapas. A eficiência final da produção está intrinsecamente dependente dos processos utilizados em cada uma dessas etapas. De seguida é apresentado um fluxograma onde se encontram representados os processos mais importantes para cada uma das etapas da produção de biodiesel a partir de microalgas.

4.4.Fluxograma



4.5. Seleção da espécie de microalga

A seleção da espécie de microalga apropriada é um fator crucial para o sucesso final de produção de biocombustíveis a partir de microalgas. A bibliografia aponta as seguintes características como as mais importantes para a seleção da espécie de microalga (Brennan e Owende 2010; Li *et al.* 2011):

1. Elevada taxa de crescimento;
2. Alto conteúdo lipídico;
3. Nos sistemas de cultura fechados deve ser robusta de forma a suportar situações de stress no interior dos fotobiorreactores;
4. Nos sistemas de cultura abertos deve ser capaz de ser a espécie dominante;
5. Deve ter alta capacidade de reter CO₂;
6. Consuma poucos nutrientes;
7. Ser tolerante a uma grande gama e variação de temperaturas resultantes dos ciclos diurnos e sazonais;
8. Conseguir fornecer subprodutos valiosos;
9. Apresentar características de autofloculação.

Brennan e Owende (2010) afirmam que atualmente não é conhecida nenhuma espécie capaz de satisfazer por completo todas as características anteriormente referidas.

Um dos primeiros aspetos a ter em conta na escolha da espécie de microalga a cultivar deve ser a sua dominância sobre as outras. Para isso devem ser escolhidas espécies endógenas pois já se encontram adaptadas ao ambiente. Contudo, não é dado como garantido que a microalga endógena seja a preferível para a produção de biocombustíveis. Nesses casos pode ser necessário e aconselhada a manipulação genética (Brennan e Owende 2010).

A engenharia genética terá, com certeza, um papel importante a desempenhar no que diz respeito não só ao aumento do desempenho da produção lipídica de algumas espécies, mas também, noutras características intrínsecas das mesmas.

Há um aumento cada vez maior no interesse da utilização de microalgas transgénicas e nos subprodutos de valor acrescentado que são capazes de produzir, e os avanços neste campo, embora em fases muito preliminares, parecem encorajadores (Dunahay *et al.* 1996; Brennan e Owende 2010).

4.6. Produção de biomassa algal

As microalgas são organismos extremamente flexíveis do ponto de vista adaptativo (euriécicos), podendo ser observadas tanto em ambientes marinhos como em ambientes dulçaquícolas (Moazami *et*

al. 2012), o que traz claras vantagens quando comparadas com as habituais culturas terrestres utilizadas para a produção de biocombustíveis.

Estas capacidades adaptativas proporcionam uma maior versatilidade nas modalidades de cultura, com potencial para minimizar o uso e os impactos ambientais adversos nos recursos naturais solo e água (Chisti 2007; Chisti 2008; Franco *et al.* 2013). Contudo, a temperatura e o pH devem ser controlados de forma a situarem-se no intervalo de tolerância das microalgas cultivadas se possível a situarem-se na zona ótima. Tanto os intervalos de tolerância como a zona ótima podem variar bastante de espécie para espécie (Andersen 2005; Chisti 2007; Franco *et al.* 2013).

Assim sendo, a produção de microalgas torna-se num processo bastante diversificado, quer a nível de metabolismo, quer nos métodos de produção utilizados (Ramalho 2013) havendo por isso uma grande diversidade de metodologias que podem ser aplicadas.

4.6.1. Metabolismo

Tanto a produtividade como a composição final de cada microalga depende essencialmente da forma e condições de cultura e do metabolismo em que a mesma é realizada (Chojnacka e Marquez-Rocha 2004).

As microalgas podem apresentar metabolismo autotrófico, heterotrófico e mixotrófico sendo que a principal diferença reside na fonte de energia e de carbono (Chojnacka e Marquez-Rocha 2004; Chisti 2007; Chen *et al.* 2011; Franco *et al.* 2013).

A maioria das microalgas é autotrófica. As células utilizam a energia solar como fonte de energia, o carbono e outros macronutrientes proveem de fontes inorgânicas (Chojnacka e Marquez-Rocha 2004; Chen *et al.* 2011). Esta forma de cultura é a mais estudada e referenciada na literatura pois é aquela que aparenta demonstrar mais vantagens, quer económicas quer ambientais. Nomeadamente a utilização do CO₂ resultante de processos industriais de forma a mitigar as emissões de GEE, funcionando como sequestrador de carbono, e a utilização de águas residuais como meio de cultura, fornecendo assim os macronutrientes necessários para o seu crescimento (Franco *et al.* 2013).

As microalgas heterotróficas utilizam carbono orgânico como fonte de energia, geralmente sob a forma de glucose, não se verificando necessidade de energia luminosa (Chen *et al.* 2011; Ramalho 2013; Chojnacka e Marquez-Rocha 2004). Este tipo de cultura pode evitar problemas associados à fraca penetração da luz solar em fotobiorreactores com grande densidade de microalgas (Chen *et al.* 2011).

As microalgas mixotróficas conseguem efetuar ambos os processos metabólicos (Chojnacka e Marquez-Rocha 2004; Chen *et al.* 2011; Ramalho 2013).

Sobre as formas de cultura heterotrófica existem menos dados do que sobre a cultura de forma autotrófica, tal pode ser comprovado por Chen *et al.* (2011) que reuniram uma extensa quantidade de

resultados obtidos por outros autores acerca do conteúdo lipídico e produtividade de diversas espécies de microalgas, consoante o tipo de cultura efetuado.

Os poucos estudos sobre as culturas de microalgas de forma heterotrófica e mixotrófica devem-se ao facto de estas utilizarem fontes de carbono orgânico, o que segundo Franco *et al.* (2013) traz preocupações acerca de uma possível competição pelo uso destas matérias-primas que se encontram também direccionadas para a alimentação humana. Por outro lado não devem ser descartados os estudos acerca destas formas de cultura, pois poderão trazer vantagens no aumento da produtividade primária e em conteúdo lipídico (Xie *et al.* 2001; Liu *et al.* 2008; Liang *et al.* 2009; Cheirsilp e Torpee 2012).

Tendo em conta as possíveis formas de cultura e a otimização de produção lipídica Cheirsilp e Torpee (2012) realizaram ensaios fotoautotróficos, heterotróficos e mixotróficos para diferentes espécies de microalgas. Os resultados são apresentados na figura 6, onde podemos verificar que todas as espécies de microalgas incluídas nesse estudo, revelaram um aumento da produção lipídica quando cultivadas mixotroficamente.

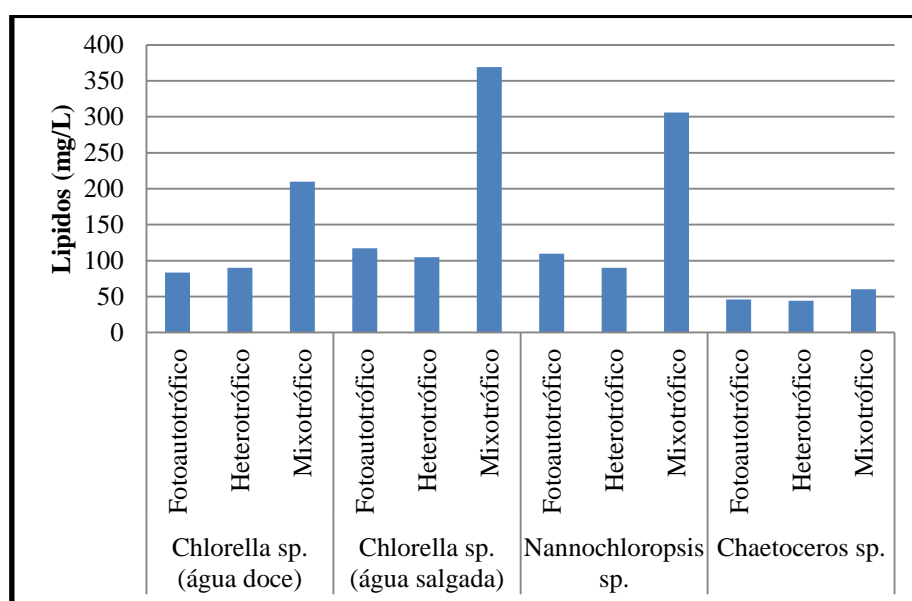


Figura 6 - Concentração de lípidos de diversas microalgas segundo o seu metabolismo. (adaptado de Cheirsilp e Torpee 2012).

4.6.2. Potenciadores da produtividade lipídica

Para além do metabolismo de cada espécie de microalgas, existem outros fatores que podem influenciar positivamente a produtividade lipídica, como por exemplo a intensidade luminosa, a salinidade e os nutrientes, particularmente a cultura em meios com ausência de azoto.

Diversos estudos têm sido elaborados no sentido de se estudar qual a espécie de microalga que melhor reage à privação de azoto. As espécies do género *Chlorella* são referenciadas como

organismos que na ausência de azoto são capazes de acumular uma maior quantidade lipídica (175 para 385 g/kg) a custo de uma menor taxa de crescimento (0,99 para 0,77 dia⁻¹) (Lardon et al. 2009). Estes valores podem variar consoante os meios de cultura que estiverem a ser utilizados, devido a essa especificidade deve ser avaliado para cada caso e cada espécie se o aumento da quantidade lipídica compensa a perda da biomassa produzida.

Su *et al.* (2010) realizaram um estudo tendo em vista o aumento do conteúdo lipídico da espécie *Nannochloropsis oculata*, na ausência de azoto. O ensaio foi dividido em duas fases. Na primeira fase a microalga foi cultivada durante cinco dias, com intensidade luminosa constante e arejamento de 2L/min, num meio de cultura capaz de fornecer todos os nutrientes necessários ao organismo em estudo. Após esses cinco dias, foi realizada a colheita e as microalgas foram inoculadas num meio de cultura privado de azoto com a mesma intensidade luminosa e com um arejamento de 0,5L/min enriquecido com 2% de CO₂, e foram cultivadas durante quatro dias. Simultaneamente foi realizado um ensaio em branco onde foram mantidas as mesmas condições durante os nove dias (Figura 7).

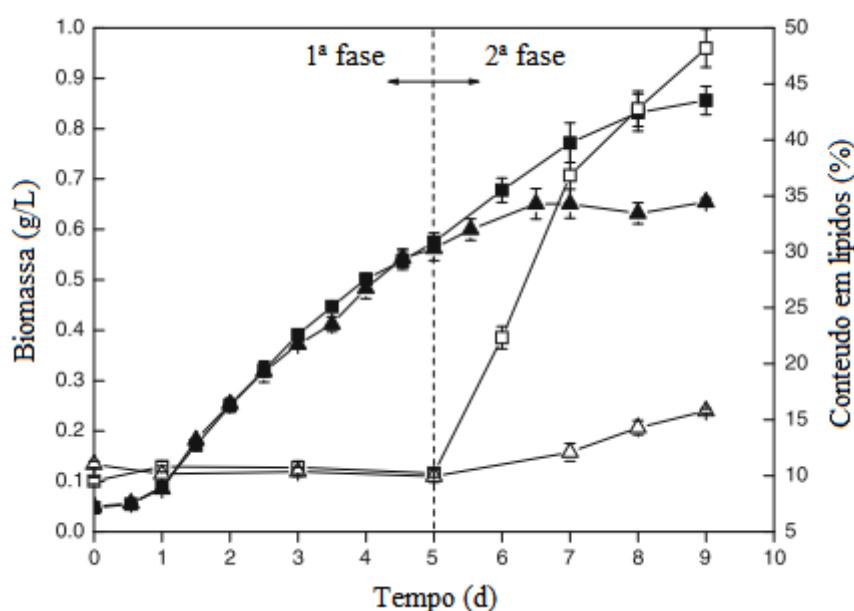


Figura 7 - Concentração de biomassa e conteúdo lipídico da espécie *Nannochloropsis oculata* quando cultivada na privação de azoto. Os triângulos representam o ensaio em branco e os quadrados o ensaio em duas fases. Os símbolos a cheio representam a biomassa e os vazios o conteúdo lipídico (Su *et al.* 2010).

Este estudo revela a excelente capacidade da microalga *Nannochloropsis oculata* de aumentar o seu conteúdo lipídico quando privada de azoto. Verifica-se também um aumento da concentração de biomassa, que se deve principalmente ao aumento do conteúdo lipídico de cada célula. Posteriormente a este ensaio, Su *et al.* (2010) testaram o efeito da luminosidade e da salinidade na produção de lipídios da mesma microalga dentro dos parâmetros atrás referidos. Os resultados são apresentados na tabela seguinte:

Tabela 6 – Efeito de diferentes concentrações de salinidade e da radiância no conteúdo e produção lipídica.

(adaptado de Su *et al.* 2010)

Ensaio	Salinidade (g/L)	Radiância ($\mu\text{mol fotões/m}^2/\text{s}$)	Conteúdo lipídico (%)	Produção lipídica (g/L/dia)
1	0	300	35	0,231
2	35	300	41	0,287
3	70	300	43,2	0,245
4	35	100	22,5	0,103
5	35	500	44,5	0,324

Podemos verificar que tanto a salinidade como a radiância têm um impacto direto na produção de lípidos. A espécie *Nannochloropsis oculata* conseguiu atingir um conteúdo lipídico na ordem dos 44,5% com uma salinidade de 35g/L e uma radiância de 500 $\mu\text{mol fotões/m}^2/\text{s}$.

Embora estes valores de salinidade e de radiação solar possam potenciar a produção de lípidos, também podem funcionar como inibidores de crescimento.

As microalgas podem sofrer de fotoinibição, ou seja, quando se encontram expostas a uma grande intensidade luminosa, o processo fotossintético abrande e pode não ocorrer crescimento da biomassa algal (Chisti 2008; Schenk *et al.* 2008) apesar disso a foto inibição raramente acontece na cultura de microalgas, pois as microalgas encontram-se dispersas na coluna de água e não se encontram constantemente sobre fortes intensidades de radiação solar.

O trabalho realizado por Su *et al.* (2010) mostra como pode ser benéfico a cultura de microalgas em duas fases, a primeira direcionada para o crescimento de biomassa algal, e a segunda focada no aumento da concentração e da produtividade lipídica.

4.6.3. Águas residuais como fonte de nutrientes e CO₂ industrial como fonte de carbono

Como referido anteriormente, a base de crescimento das microalgas; para além de outros fatores, assenta na assimilação de carbono e de outros nutrientes. Como forma de melhorar o desempenho ambiental do processo, aconselha-se a obtenção das matérias-primas para o crescimento onde estas sejam consideradas resíduos, nomeadamente águas residuais urbanas ou industriais e CO₂ proveniente de centrais de produção de energia. Os efluentes provenientes de determinadas indústrias não podem ser utilizados na cultura de microalgas devido à sua elevada toxicidade para as microalgas.

As águas residuais são constituídas por uma mistura complexa de compostos orgânicos e inorgânicos, bem como por compostos de síntese produzidos pela espécie humana, três quartos do carbono orgânico está presente sobre a forma de glúcidos, gorduras, proteínas, aminoácidos e ácidos

voláteis. Nos constituintes inorgânicos podemos encontrar sódio, cálcio, potássio, magnésio, cloro, enxofre, fosfatos, sais de amônio e metais pesados (Abdel-Raouf *et al.* 2012).

O tratamento terciário de águas residuais tem em vista a remoção de potenciais organismos patogénicos e também a remoção de azoto e fósforo. Assim sendo, e tendo as microalgas a necessidade desses nutrientes para o seu crescimento a sua utilização como tratamento terciário de águas residuais apresenta-se como uma excelente solução.

Um dos pontos fracos na ACV da produção de biocombustíveis é precisamente o uso de água e a provisão de nutrientes. Estes dois fatores são aqueles que podem pesar mais no balanço ambiental final. De forma a mitigar este ponto fraco no cultivo, Yang *et al.* (2011) realizaram um estudo com o objetivo de quantificar a pegada da água e uso de nutrientes necessários para a produção de 1kg de biodiesel a partir de microalgas. O processo estudado nesta investigação envolve a cultura de *Chlorella vulgaris* (em condições idênticas ao verão na Califórnia) em lagoas fotossintéticas de alta carga. A colheita, secagem, extração da fase lipídica e transesterificação também foram analisadas. Foram realizados ensaios para diferentes tipos de águas. Águas residuais, água do mar e água potável. Posteriormente os resultados foram comparados e encontram-se apresentados na figura 8.

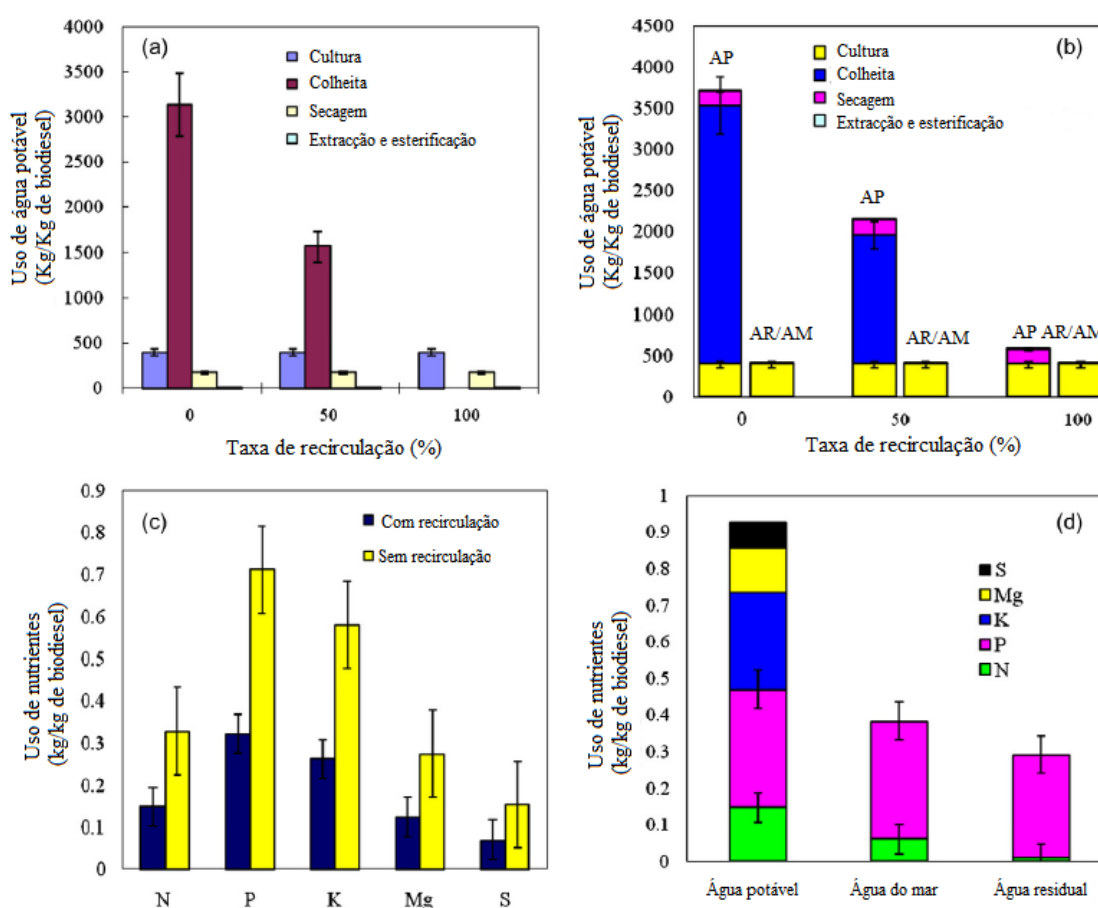


Figura 8 - Para produzir 1kg de biomassa: (a) pegada da água usando água potável (AP); (b) pegada da água usando águas residuais (AR) ou água do mar (AM); (c) Necessidade dos principais nutrientes usando AP com e sem recirculação; (d) Necessidade dos principais nutrientes com 100% de recirculação usando AP, AM e AR (Yang *et al.* 2011).

Com este estudo os autores chegaram à conclusão de que são necessários 3726l de água potável, 0,33Kg de azoto e 0,71Kg de fósforo para se produzir 1Kg de biodiesel proveniente da microalga *Chlorella vulgaris*. Quando utilizamos a recirculação da água de colheita conseguimos reduzir a quantidade de água e de nutrientes em 84% e 55% respetivamente. Usando águas residuais, o estudo revela que conseguimos reduzir em 90% o uso de água e eliminamos a necessidade de adição de nutrientes à exceção do fósforo (fator limitante neste estudo), que dependendo da proveniência do efluente poderá não se encontrar em quantidades suficientes pois é um dos nutrientes mais consumidos pela biomassa algal na produção de fosfolípidos.

Este estudo revela a importância da recirculação do meio de cultura e da utilização de águas residuais como fonte de nutrientes para a mitigação dos custos monetários inerentes à produção de biocombustíveis e dos impactos que a sua produção tem no ambiente.

Outro aspeto importante é saber em que medida as microalgas serão uma boa alternativa para o tratamento de água. Para isso a remoção de fósforo e azoto são características importantes a ter em conta.

No trabalho de Ruiz-Marin *et al.* (2010) foi avaliado o potencial das espécies *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus obliquus* na remoção destes nutrientes em águas residuais urbanas (Tabela 7). As microalgas foram cultivadas durante 48h em águas residuais urbanas com concentrações típicas de N- NH_4^+ igual a 32,5mg/L e P- PO_4^{3-} igual a 2,5mg/L. O ensaio foi realizado em triplicado e em cada um deles foi utilizada água residual urbana colhida em diferentes alturas do dia e da semana. Para o ensaio em branco foi preparado um meio de cultura artificial, tendo como modelo as concentrações típicas daquele efluente. Desta forma foi possível analisar não só as taxas de crescimento e remoção de nutrientes com também avaliar em que medida a variação de concentrações nos efluentes urbanos influencia as taxas de crescimento e remoção de nutrientes.

Numa avaliação global, podemos verificar que ambas as espécies conseguem providenciar uma remoção eficaz do azoto e fósforo. Contudo a microalga *Scenedesmus obliquus* obteve melhor taxa de crescimento que a microalga *Chlorella vulgaris*, o que a pode indicar como favorita para estudos de produtividade lipídica.

Tabela 7 - Taxas de crescimento e percentagem de remoção de nutrientes para *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus obliquus* em diferentes tipos de águas residuais (adaptado de Ruiz-Marin *et al.*, 2010).

Espécie de microalga	Meio de cultura	Taxa de crescimento (dia ⁻¹)	Remoção N-NH ₄ (%)	Remoção P-PO ₄ (%)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Água residual urbana	0,186	60,1	80,3
	Água residual artificial	0,377	74,3	70,2
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Água residual urbana	0,285	100	83,3
	Água residual artificial	0,401	100	60,0

Neste trabalho fica bem patente uma das possíveis desvantagens na utilização de águas residuais para a produção de biomassa com fins energéticos: A variação das concentrações de nutrientes específicos na constituição dos efluentes pode ter efeitos negativos na produtividade de biomassa e também na produtividade lipídica. Para além disso, pode ocorrer a contaminação por bactérias e fungos que podem dizimar toda a cultura de microalgas.

As microalgas, devido à sua eficiência fotossintética têm uma maior capacidade de fixar o CO₂ que as plantas terrestres e por isso são consideradas eficientes sumidouros de CO₂. O CO₂ utilizado pelas microalgas pode ser atmosférico, proveniente de centrais elétricas ou o CO₂ dissolvido sobre a forma de carbonatos (Brennan e Owende 2010; Devi e Mohan 2012).

A utilização de CO₂ proveniente de indústrias para o crescimento de biomassa é um aspeto importante a ter em conta, pois pode trazer melhoramentos no aumento da produção lipídica e também no desempenho ambiental.

Contudo, os gases de combustão industriais, habitualmente, contêm elevadas concentrações de CO₂, NO_x e SO_x e encontram-se a elevadas temperaturas. A sua injeção direta no meio de cultura vai ter consequências negativas no cultivo. Lam *et al.* (2012) sugerem, para contornar estes problemas, que os gases de combustão passem num permutador de calor e numa unidade de dessulfurização para retirar o SO₂, se assim o justificar.

Nem todas as microalgas conseguem suportar grandes concentrações destes gases. Espécies de microalgas como *Chlorella* sp., *Botryococcus braunii* ou *Scenedesmus* sp. conseguem suportar tolerâncias de CO₂ máximas de 20% (Lam *et al.* 2012).

A solubilidade do CO₂ em água e o baixo tempo de retenção do mesmo levam a que, muito do CO₂ que é aplicado seja libertado para a atmosfera sem que haja a oportunidade de ser fixado pelas

microalgas. É importante que a sua aplicação seja efetuada sob a forma de microbolhas, isto para aumentar o seu tempo de retenção e potenciar a sua dissolução no meio, e normalmente é aplicado em mistura com o arejamento. Os difusores devem encontrar-se no fundo dos reatores ou lagoas para promover a homogeneização e circulação do meio (Lam *et al.* 2012).

De forma a avaliar o impacto que a injeção de CO₂ tem no aumento do conteúdo lipídico, Devi e Mohan (2012) realizaram um ensaio em duas fases. Na primeira fase, a cultura mista de microalgas foi cultivada em águas residuais sob metabolismo mixotrófico, tendo em vista apenas o seu crescimento. Na segunda fase, as microalgas colhidas foram inoculadas num meio privado dos principais nutrientes que, como já referido no capítulo anterior, traz vantagens no aumento da produção lipídica.

Durante o ensaio, foram avaliados vários intervalos de injeção de CO₂ (2 horas, 4 horas e 8 horas), e vários tempos de aplicação (60 segundos, 120 segundos e 240 segundos). Os resultados são apresentados na figura 9, onde os autores verificaram que a maior percentagem lipídica foi obtida com intervalos de aplicação de 4 horas e 120 segundos de aplicação.

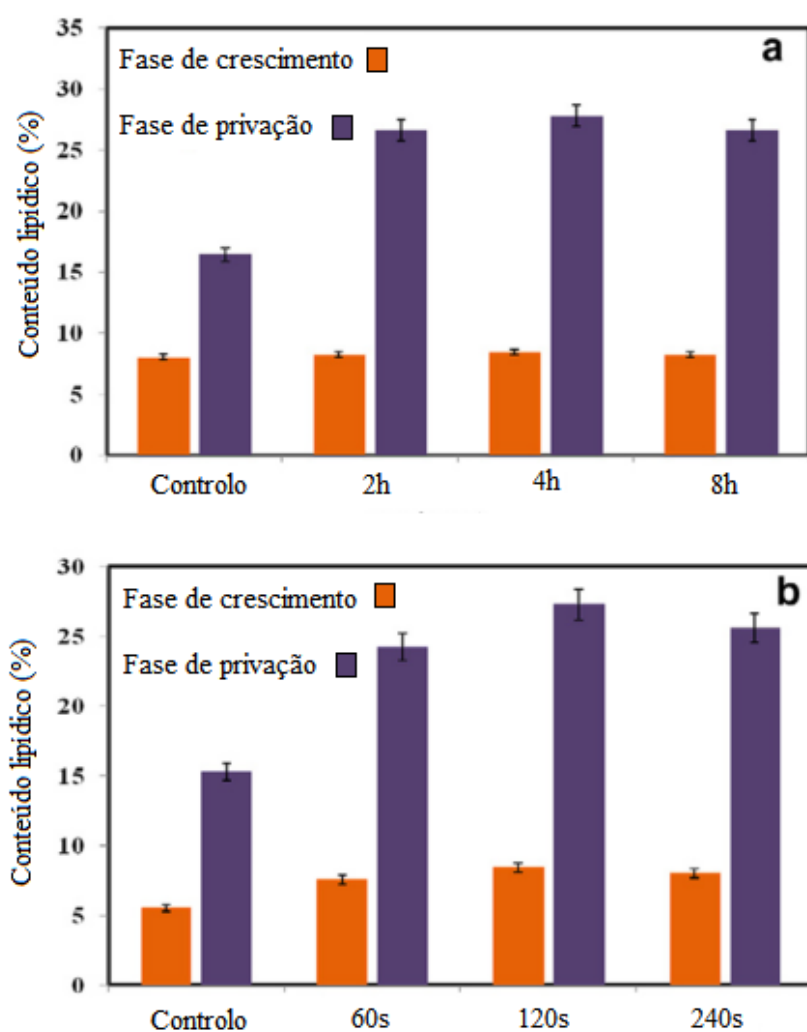


Figura 9- Conteúdo lipídico em função do tempo entre aplicações e duração de cada aplicação. (Devi e Mohan 2012).

Existem vantagens provadas na utilização de CO₂ industrial para a mitigação de emissões de GEE e também para o aumento da quantidade final em lípidos. Porém, a difusão de CO₂ provoca uma diminuição de pH do meio de cultura, que necessita estar no intervalo de tolerância da microalga cultivada. Assim sendo pode requerer constantes correções de pH que não são benéficas para o balanço energético do sistema.

4.6.4. Biorreatores

Em culturas auto e mixotróficas são utilizados biorreatores ou lagoas fotossintéticas de alta carga. No caso de a cultura ser efetuada heterotroficamente, são utilizados fermentadores. Cada sistema tem as suas vantagens e desvantagens. A escolha do sistema ideal é assente em diversos fatores com um objetivo comum, o de reduzir os custos de produção de biomassa.

Para que isso seja possível, diversos fatores devem ser controlados, nomeadamente: fornecimento de nutrientes em quantidade suficiente, temperatura ótima, pH, mistura e turbulências adequadas bem como fornecimento de CO₂, exaustão do oxigénio produzido pelas microalgas, radiação solar incidente e penetração da mesma (Carvalho *et al.* 2006).

4.6.4.1. Lagoas fotossintéticas de alta carga

As lagoas fotossintéticas de alta carga foram a primeira conceção proposta para a cultura de microalgas e ainda são a forma mais comum de produção industrial (Carvalho *et al.* 2006).

Conhecidas industrialmente como *raceway ponds* ou *open ponds*, são estruturas constituídas por um circuito fechado, em *loop*, que idealmente, não deve ter mais de 0,3 metros de profundidade para que a luz possa penetrar em toda a sua profundidade, contudo uma profundidade tão reduzida pode trazer problemas em relação ao espaço ocupado. Tanto a agitação como a circulação do meio de cultura são asseguradas por um sistema de roda de pás. Este sistema encontra-se em contínuo funcionamento de forma a assegurar a circulação do meio de cultura e prevenir a sua sedimentação (Chisti 2007).

Os canais da lagoa podem ser construídos em betão ou terra compactada e revestida por uma película de plástico para que não haja permuta do meio de cultura com o solo nem a sua percolação.

Durante o período diurno, o meio de cultura é alimentado logo a seguir à roda de pás, enquanto a colheita é realizada no final do percurso antes da mesma roda de pás. A figura 10 mostra a planta de uma lagoa fotossintética de alta carga.

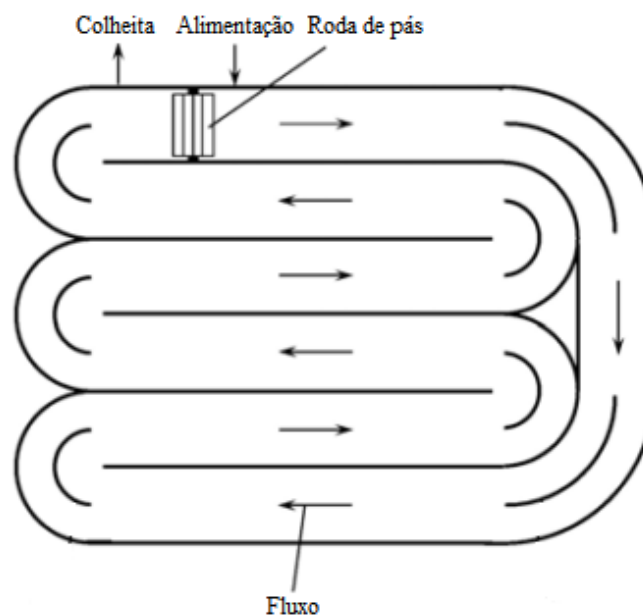


Figura 10 - Planta de uma lagoa fotossintética de alta carga. (Chisti 2007).

As lagoas fotossintéticas de alta carga são ainda preferidas para a cultura em grande escala de biomassa pelas suas vantagens. Embora tenham uma grande área, ocupam terrenos de baixo custo de oportunidade e possuem um baixo custo de construção e manutenção. (Brennan e Owende 2010). Contudo, a cultura de microalgas em lagoas fotossintéticas de alta carga tem algumas desvantagens difíceis de contornar. Devido ao facto de o sistema ser aberto, torna-o vulnerável a contaminações exteriores por outros organismos que poderão vir a competir por espaço e nutrientes. Possuem um baixo rácio entre superfície e volume em comparação com os fotobiorreactores conseguindo menos iluminação por unidade de área. A elevada taxa de evaporação que se verifica nestes sistemas, por um lado arrefece todo o sistema por outro, cria diferenças iónicas significativas que podem alterar a produtividade. A evaporação também contribui significativamente para o aumento da pegada da água da produção de microalgas utilizando este sistema.

As trocas gasosas não são eficientes, a roda de pás não provoca agitação suficiente do meio de cultura. Esta situação pode ser contornada com, por exemplo, arejadores de superfície, submersíveis ou adição de mais rodas de pás. Como contrapartida temos um aumento do consumo energético.

Todos estes fatores caracterizam a cultura em sistemas abertos como sendo sistemas de baixa produtividade mas com menor custo de produção (Chisti 2007; Brennan e Owende 2010; Harto *et al.* 2010; Franco *et al.* 2013). Como consequência desta baixa produtividade por unidade de área temos meios de cultura com baixas concentrações, provocando um aumento do volume de colheita, traduzindo-se assim num aumento do custo do produto final (Carvalho *et al.* 2006).

4.6.4.2. Fotobiorreactores

A produção de microalgas em sistemas fechados veio como uma resposta natural a alguns dos problemas encontrados nos sistemas abertos. Ao contrário das lagoas fotossintéticas, os fotobiorreactores permitem uma monocultura de microalgas durante longos períodos de tempo sem que ocorra contaminação por outras espécies (Chisti 2007).

Devido à maior área de exposição solar e à possibilidade de se controlar com mais rigor o meio de cultura, conseguem-se atingir maiores taxas de crescimento e maiores concentrações de biomassa no reator. Uma concentração mais elevada reduz os custos associados à colheita das microalgas, pois não é necessário processar um volume de colheita tão grande como nas lagoas fotossintéticas (Brennan e Owende 2010).

Embora sejam sistemas com baixas necessidades hídricas, o facto de não existir evaporação traz problemas no controlo da temperatura. Para além disso, são sistemas que requerem um capital investido maior.

Os fotobiorreactores são dimensionados com o intuito de utilizar ao máximo a radiação solar. Carvalho *et al.* (2006) referem este parâmetro como o principal responsável pelo *design* dos biorreactores, visto a penetração da luz solar ser um fator crucial quando temos em vista o aumento da produtividade. Assim sendo o *design* dos biorreactores deve ser aquele que tenha a maior razão entre superfície e volume, para que a radiação solar possa penetrar o mais possível na massa de água.

O *design* dos fotobiorreactores tem vindo a evoluir rapidamente de forma a fazer face à necessidade de produção industrial. Segundo (Wang *et al.* 2012) os fotobiorreactores tubulares e os fotobiorreactores *flat-plate* são as configurações mais promissoras para produção industrial.

4.6.4.2.1. Fotobiorreactores Flat-Plate

Os fotobiorreactores *flat-plate* são referenciados na bibliografia como sendo sistemas com uma produtividade primária por unidade de área superior aos sistemas de lagoas fotossintéticas de alta carga, conseguido uma boa concentração de biomassa, pois estão concebidos para possuir uma elevada razão entre área iluminada e volume (Carvalho *et al.* 2006). São sistemas robustos, capazes de trabalhar em contínuo por longos períodos de tempo tal como as lagoas fotossintéticas de alta carga (Mata *et al.* 2010; Necton 2014).

Os fotobiorreactores *flat-plate* são constituídos por painéis em forma de paralelepípedo, construídos em material transparente, que pode ser vidro ou plástico. A largura do reator deve ser extremamente reduzida em relação à altura de forma a aumentar o rácio superfície/volume.

Na figura 12 podemos observar o esquema de funcionamento de um fotobiorreactor *flat-plate*. O arrefecimento do meio de cultura é efetuado através de um permutador de calor ou através de água que

escorre pelas paredes exteriores dos painéis (Figura 11) ambos os sistemas necessitam de uma bomba para recircular, ou o meio de cultura para o permutador ou a água de arrefecimento. Outra bomba faz a alimentação do meio. O ar enriquecido em CO_2 é injetado na base do reator, fornecendo a fonte de carbono necessária ao crescimento da biomassa algal e a turbulência suficiente para expor a totalidade da biomassa à luz solar (Figuras 11 e 12).

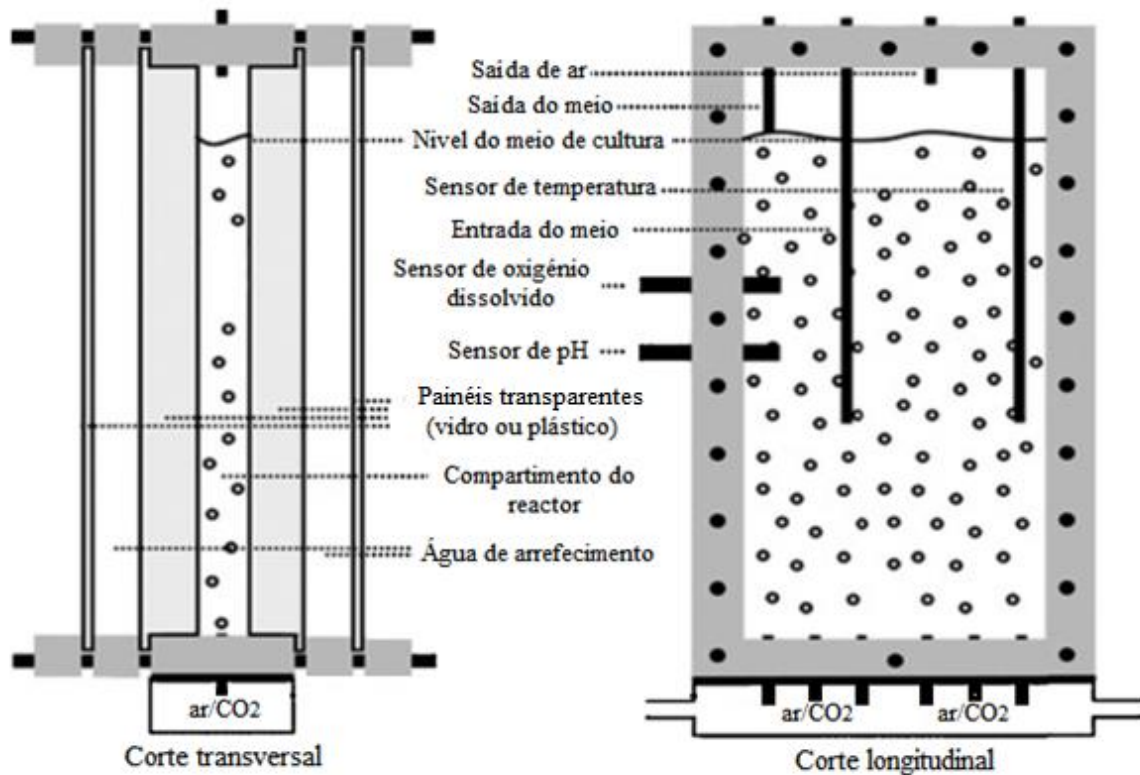


Figura 11- Corte transversal e longitudinal de um painel de um fotobiorreator *flat-plate*. (Singh e Sharma 2012).

Os painéis do fotobiorreator devem ser posicionados de forma a garantir a melhor eficiência na absorção da radiação solar incidente (ver orientação na figura 13). Um bioreactor que esteja orientado no sentido este-oeste tem o declive da curva da produtividade vs. Irradiação 1,4 vezes superior a um que esteja orientado sul-norte (Wang *et al.* 2012).

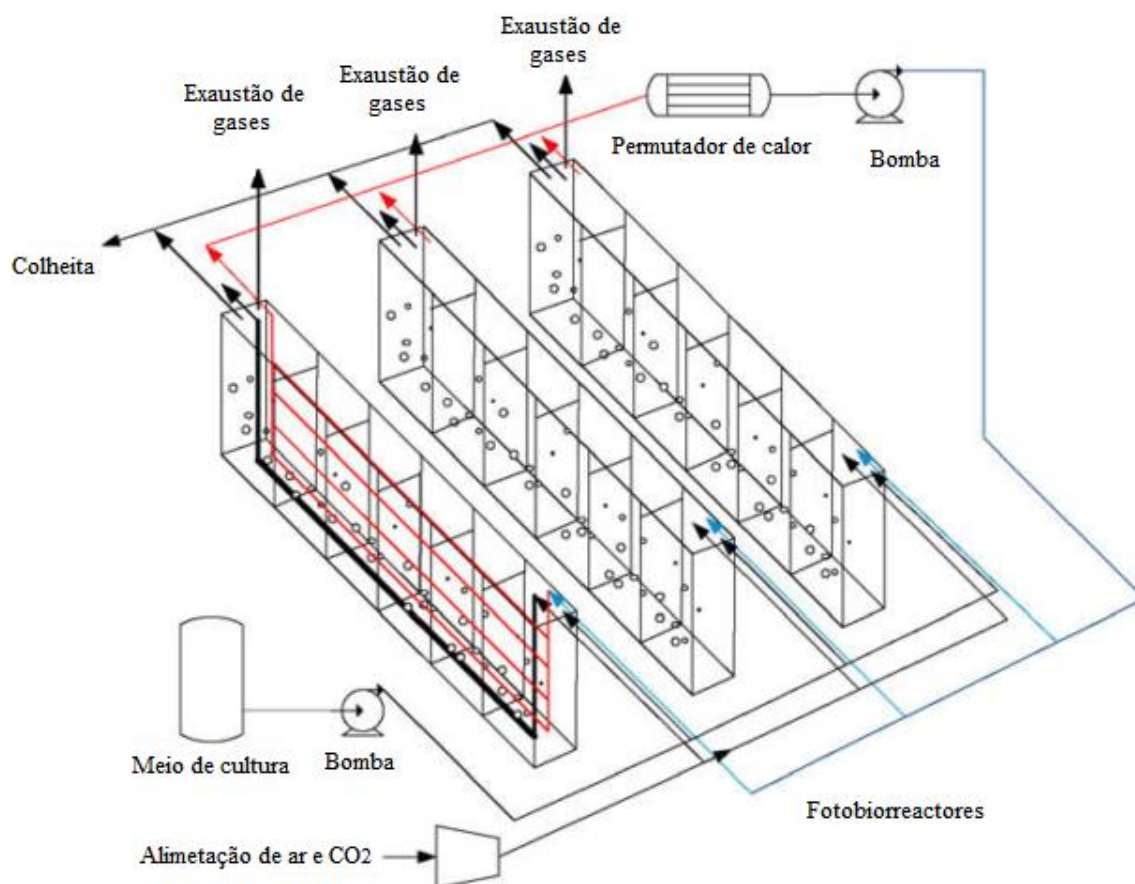


Figura 12- Esquema de funcionamento de um fotobiorreator *flat-plate*. (Jorquera *et al.* 2010)

As principais limitações deste sistema encontram-se na dificuldade de controlar a temperatura do meio de cultura, os *inputs* energéticos e a dificuldade de *scale-up* para instalações industriais.

Existe ainda a possibilidade de ocorrer crescimento de biomassa nas paredes dos painéis, o que provoca uma diminuição da radiação incidente disponível, diminuindo assim a produtividade primária.

4.6.4.2.2. Fotobiorreactores tubulares

Tal como os fotobiorreactores *flat-plate*, os fotobiorreactores tubulares são concebidos para obter o máximo aproveitamento da radiação solar. Estes reatores podem ser horizontais, verticais ou helicoidais.

Os fotobiorreactores tubulares consistem numa série de tubagens transparentes (coletores solares), que são construídos em vidro ou plástico, onde a radiação solar incide. Habitualmente estes tubos não têm mais do que 0,1m de diâmetro, para que a radiação incidente atravessasse o tubo na totalidade, promovendo a fotossíntese e assegurando uma alta produtividade (Chisti 2007).

Na figura 13 podemos observar o esquema de funcionamento de um fotobiorreator tubular horizontal. Os coletores solares devem estar orientados na direção sul-norte e encontram-se dispostos uns por cima dos outros de forma a aumentar o número de tubos por unidade de área. O solo onde os

coletores solares assentam deve ser constituído por uma superfície com elevado albedo, de forma a aumentar a radiação solar incidente (Chisti 2008).

Neste tipo de sistemas é habitual haver problemas com o sobreaquecimento do meio, a rápida depleção do CO_2 e a acumulação de O_2 , que originam variações acentuadas no valor de pH. Para diminuir estas desvantagens, os fotobiorreactores tubulares devem ser sempre acompanhados por um desgasificador. Este tem como principais funções a exaustão de O_2 e injeção de CO_2 na base. Como funções secundárias, promove o arrefecimento do meio (permutador de calor) e fornece meio de cultura fresco. Contudo, não evita a criação de gradientes ao longo dos tubos. A acumulação de biomassa à superfície dos tubos também é um problema neste tipo de reatores, pois a lavagem dos mesmos é mais dispendiosa do que nos outros fotobiorreactores. Pode ser realizada manualmente, através de instrumentos próprios ou pode ser feita a lavagem em contracorrente sob pressão. Este ultimo método de lavagem, requer o uso de água e energia elétrica.

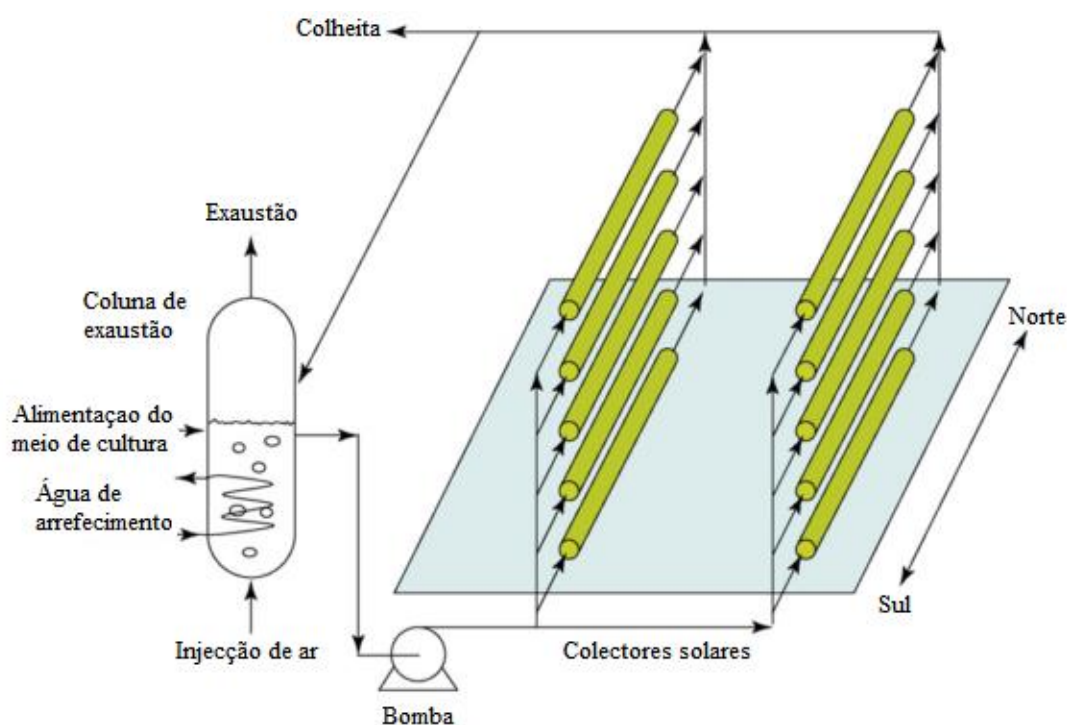


Figura 13 - Esquema de funcionamento de um fotobiorreactor tubular horizontal. (Chisti 2008).

4.6.4.2.3. Fotobiorreactores airlift

Estes fotobiorreactores são constituídos por uma coluna com duas zonas interconectadas. Na base de uma das zonas faz-se a injeção de ar e CO_2 através de um difusor, que reduz a densidade do meio, fazendo com que este suba pela coluna (zona de ascensão). Ao chegar ao topo da coluna as bolhas de gás são libertadas e o fluido perde densidade, descendo do outro lado da coluna, na zona descendente.

Estes biorreactores são caracterizados por uma excelente mistura e turbulência num padrão circular, favorecendo as trocas gasosas e a fotossíntese (Wang *et al.* 2012).

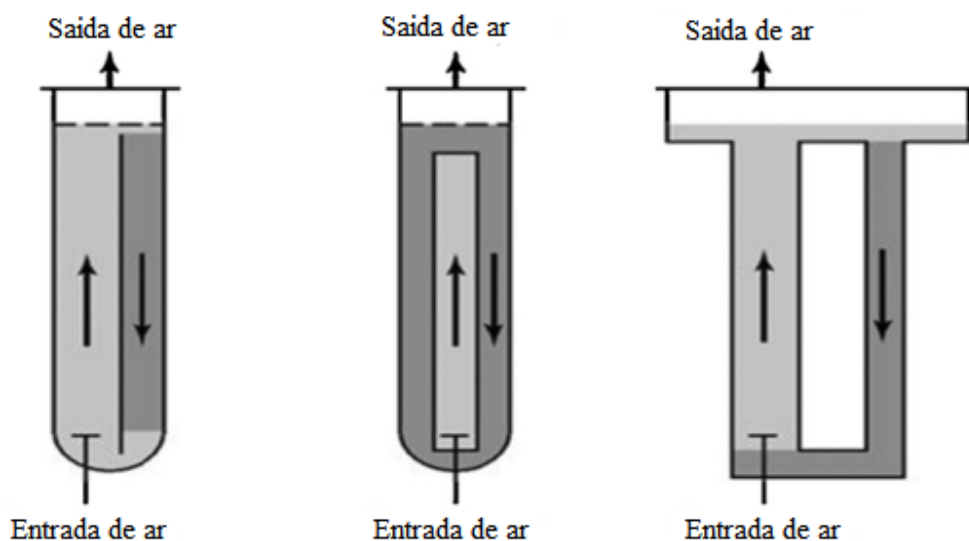


Figura 14 - Várias configurações de fotobiorreatores *airlift*. (Singh e Sharma 2012).

Uma das principais desvantagens destes biorreactores é a reduzida superfície de iluminação quando comparados com os fotobiorreactores tubulares ou *flat-plate*, o que lhe confere uma menor produtividade primária, para além de existirem dificuldades no *scale-up* para nível industrial.

4.6.4.3. Vantagens e desvantagens dos biorreactores

A tabela seguinte apresenta sumariamente as vantagens e as desvantagens dos biorreactores referidos anteriormente.

Tabela 8 – Tabela sumária das vantagens e desvantagens das lagoas fotossintéticas e fotobiorreactores.

Sistema de cultivo	Vantagens	Desvantagens
Lagoas fotossintéticas de alta carga	<ul style="list-style-type: none"> Baixo custo de capital investido e manutenção Fácil limpeza Baixos <i>inputs</i> energéticos Melhor arrefecimento 	<ul style="list-style-type: none"> Baixa produtividade Necessidade de grandes áreas Possibilidade de contaminação do meio de cultura Perda de água por evaporação Deficientes trocas gasosas Custo da colheita mais elevado
Fotobiorreactores <i>Flat-Plate</i>	<ul style="list-style-type: none"> Bom controlo das condições de cultura Boa superfície de iluminação Boa produtividade Boas trocas gasosas Menor custo de investimento que os fotobiorreactores tubulares 	<ul style="list-style-type: none"> Investimento para a construção Dificuldade no controlo da temperatura Dificuldade de <i>scale-up</i> para nível industrial Crescimento de biomassa nas paredes dos painéis <i>Inputs</i> energéticos
Fotobiorreactores tubulares	<ul style="list-style-type: none"> Bom controlo das condições de cultura Excelente superfície de iluminação Boa produtividade, melhor que os fotobiorreactores <i>flat-plate</i> 	<ul style="list-style-type: none"> Investimento para a construção e manutenção Dificuldade no controlo da temperatura Dificuldade de <i>scale-up</i> para nível industrial Crescimento de biomassa nos tubos <i>Inputs</i> energéticos
Fotobiorreactores <i>airlift</i>	<ul style="list-style-type: none"> Bom controlo das condições de cultura Excelentes trocas gasosas Baixos <i>inputs</i> energéticos 	<ul style="list-style-type: none"> Menor produtividade Crescimento de biomassa nas paredes da coluna

Enquanto nalguns casos, para algumas microalgas e para certas aplicações o custo de investimento pode ser baixo, noutros a alta produtividade e concentração dos fotobiorreactores pode não compensar o alto capital investido na construção e operação (Mata *et al.* 2010).

A iluminação interna dos fotobiorreactores pode ser aplicada a qualquer uma das estruturas mencionadas. A radiação solar é recolhida num painel especial e transferida através de feixes de fibra ótica que se encontram submersos no meio de cultura. Contudo, o capital inicial, a limpeza regular e perda de energia ao longo dos feixes de fibra ótica são ainda entraves ao uso comercial desta abordagem (Wang *et al.* 2012).

4.6.4.4. Sistemas híbridos

Os sistemas híbridos têm como objetivo juntar as vantagens de dois sistemas tentando superar as desvantagens de cada um e aumentar a produtividade primária (Singh e Sharma 2012). Normalmente juntam as vantagens dos sistemas *airlift* com sistemas tubulares ou *flat-plate*.

Os sistemas *airlift flat-plate* (Figura 15) conjugam os dois sistemas de forma a aumentar a turbulência e trocas gasosas no reator. Para além do aumento da produtividade, este sistema dispensa a utilização de uma bomba de circulação (Carvalho *et al.* 2006), que segundo Chisti (2008), podem danificar a biomassa. A recirculação é assegurada pela injeção de ar e CO₂.

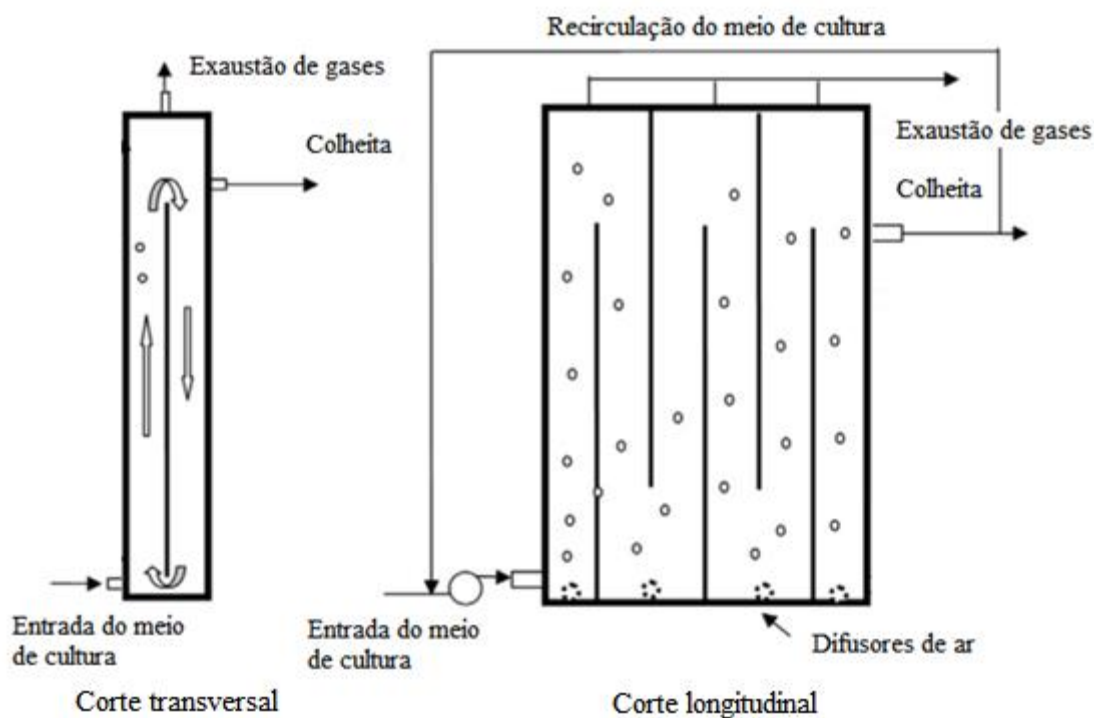


Figura 15 - Corte transversal e longitudinal de um fotobiorreactor *airlift flat-plate*. (Wang *et al.* 2012).

O sistema airlift pode ser acoplado a um fotobiorreator tubular (Figura 16). Este sistema forma uma configuração bastante idêntica aos fotobiorreatores tubulares, mas neste caso dispensa-se a utilização de uma bomba de circulação, e o sistema airlift promove as trocas gasosas.

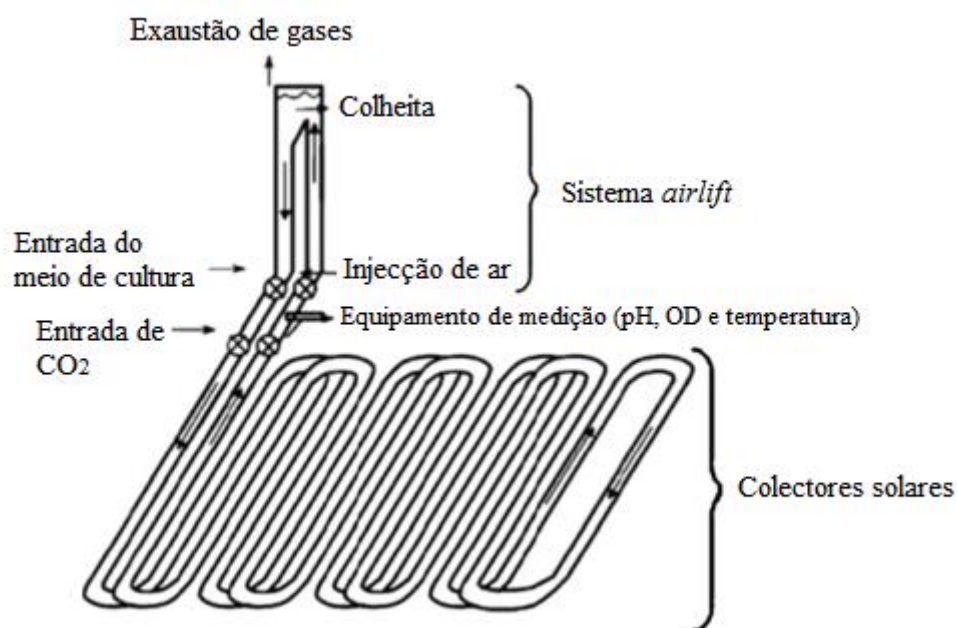


Figura 16 - Fotobiorreator tubular helicoidal acoplado a sistema *airlift* (Singh e Sharma 2012).

Os fotobiorreatores α -shape (Figura 17) são um sistema desenvolvido por Lee *et al.* (1995) e são também uma mistura de fotobiorreator tubular com fotobiorreator *airlift*. A circulação do meio e trocas gasosas são asseguradas pelo sistema *airlift*, e o sistema tubular é o responsável pelo elevado rácio área/volume. Este sistema para além de possuir uma boa produtividade, necessita de pouca energia para fazer ascender o fluido, Lee *et al.* (1995) conseguiram um caudal de circulação de 16,2 L/min com um caudal de ar de 7,8L/min. Segundo Carvalho *et al.* (2006) as tubagens devem estar dispostas num ângulo de 45° de forma a retirar o máximo da radiação solar incidente.

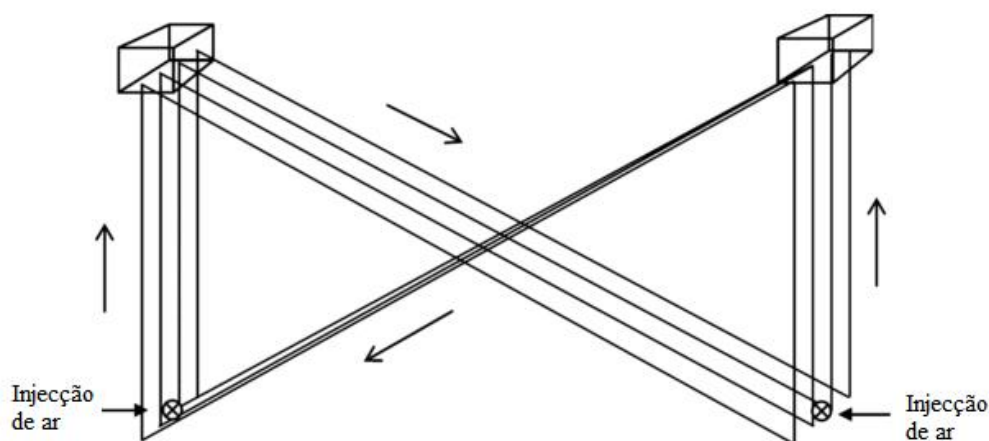


Figura 17 - Fotobiorreator α -shape (Carvalho *et al.* (2006).

4.7. Colheita e secagem da biomassa microalgal

O facto de as microalgas possuírem dimensões extremamente reduzidas e se encontrarem dispersas em toda a coluna de água, cria ineficiências no processo de extração da biomassa do meio de cultura. Existem ainda outros fatores como as propriedades do meio, concentração inicial da biomassa, pH e força iónica, que têm um impacto direto na eficiência da colheita da biomassa microalgal (Udom *et al.* 2013).

Após a separação, a biomassa necessita passar por um processo de espessamento e/ou secagem, pois a jusante, os métodos clássicos de obtenção de biodiesel (extração do óleo e transesterificação), cuja eficiência está dependente da humidade residual (máximo de 10%), exigem que assim seja.

Os métodos de separação e espessamento/secagem podem tornar-se dispendiosos energeticamente, por isso são apontados como uma das limitações tecnológicas da produção de biodiesel microalgal (Collet *et al.* 2011; Ramalho 2013; Udom *et al.* 2013). Chen *et al.* (2011) afirmam que a eficiência da colheita e secagem da biomassa é fundamental para o sucesso da produção de biodiesel a partir de microalgas em escala industrial.

O processo de colheita das microalgas do meio de cultura é caracterizado por duas variáveis, a taxa de recuperação e o teor final de sólidos.

A taxa de recuperação é a relação entre a biomassa inicial e a biomassa após colheita, é expressa em percentagem, e significa o quão eficiente é o processo na recolha da biomassa do meio de cultura.

O teor final de sólidos é a relação mássica entre a biomassa algal e água onde se encontra, é expressa em percentagem e significa o espessamento das lamas. Quanto mais altos forem os valores nestas duas variáveis, mais eficiente é o processo de colheita.

A secagem, por ser também, um processo de desidratação ou espessamento é caracterizado pelo teor de sólidos finais.

A escolha das técnicas de colheita da biomassa está intrinsecamente ligada com as propriedades da mesma, nomeadamente, o tamanho, a densidade e também qual o objetivo do produto final (Brennan e Owende 2010; Udom *et al.* 2013). Por exemplo, se a cultura tiver como objetivo a obtenção de ficocianina (pigmento azul) não deve ser utilizado o cloreto de ferro como floculante, pois a cultura pode adquirir uma cor acastanhada (Udom *et al.* 2013), contudo para a produção de biocombustíveis esse aspeto é irrelevante.

4.7.1. Colheita da biomassa

A colheita da biomassa é um processo em duas fases. A primeira envolve a coagulação do meio de cultura com a adição de coagulantes, seguida de sedimentação ou flotação (Udom *et al.* 2013).

Normalmente a concentração da biomassa algal após esta fase situa-se no intervalo 5 a 15% de sólidos totais. Estes valores dependem da concentração inicial da biomassa e também do processo selecionado (Brennan e Owende 2010). A água decantada proveniente deste processo devem ser reencaminhadas para o meio de cultura.

4.7.1.1. Floculação

A floculação tem como principal objetivo agregar as células para que se formem flocos. As microalgas, possuem uma carga negativa que previne a natural agregação das células, permitindo a sua flutuabilidade e evitando a sua sedimentação. A adição de floculantes tem como principal objetivo neutralizar essas cargas e favorecer o processo de sedimentação. Os floculantes mais utilizados são os mesmos que os utilizados para o tratamento de águas: o sulfato de alumínio ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$), cloreto de ferro (FeCl_3) e sulfato de ferro ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$). Para além destes floculantes inorgânicos existe a possibilidade de se utilizarem floculantes naturais (biofloculantes), como *Moringa oleífera* (Acácia-branca) ou quitosana, um polissacárido catiónico produzido a partir da quitina.

Após a floculação a biomassa pode ser recolhida por decantação ou flotação.

Udom *et al.* (2013) realizaram um trabalho tendo em vista analisar a performance de diversos floculantes. A dose ótima de coagulante utilizado foi determinada a partir de ensaios *jar-test* com a espécie *Chlorella sp.*, posteriormente foi medida a turvação, os sólidos suspensos totais e a taxa de recuperação de biomassa algal. Foram utilizados vários tipos de coagulantes, incluído biofloculantes como *Moringa oleífera* e *Opuntia ficus-indica*. Os resultados são apresentados na tabela 9.

Tabela 9 - Tabela sumária de vários coagulantes sobre a dose ótima, turbidez, SST e percentagem de biomassa algal recolhida (adaptado de Udom *et al.* 2013)

Coagulante	Dose ótima (mg/L)	Turvação (NTU)	Sólidos suspensos totais (mg/L)	Taxa de recuperação (%)
Cloreto de ferro	122	7,65	15	93
Sulfato de alumínio	140	5,4	30	91
Polímero catiónico (Zetag8819)	34	6,05	20	98
Polímero aniónico (E-38)	-	760	>500	0
<i>Moringa oleífera</i>	4670	20	25	85
<i>Opuntia ficus-indica cactus</i>	-	740	>500	0

Como podemos verificar na tabela 9, tanto o cloreto de ferro como o sulfato de alumínio conseguem obter excelentes valores na recolha da biomassa. Contudo, ambos exigem uma dosagem mais alta que o polímero cationico Zetag 8819. Este polímero foi aquele que obteve melhores

resultados com menor dosagem. A adição de *moringa oleífera* mostrou conseguir uma boa recolha de biomassa, mas a alta dosagem para atingir estes valores, desaconselha o seu uso.

Tanto o polímero E-38 como a *Opuntia ficus-indica* não são bons floculantes, isto devido à sua natureza aniónica que não permite a agregação celular (Udom *et al.* 2013).

Na figura 18 podemos observar os custos, emissões de GEE e energia consumida dos floculantes com melhor desempenho.

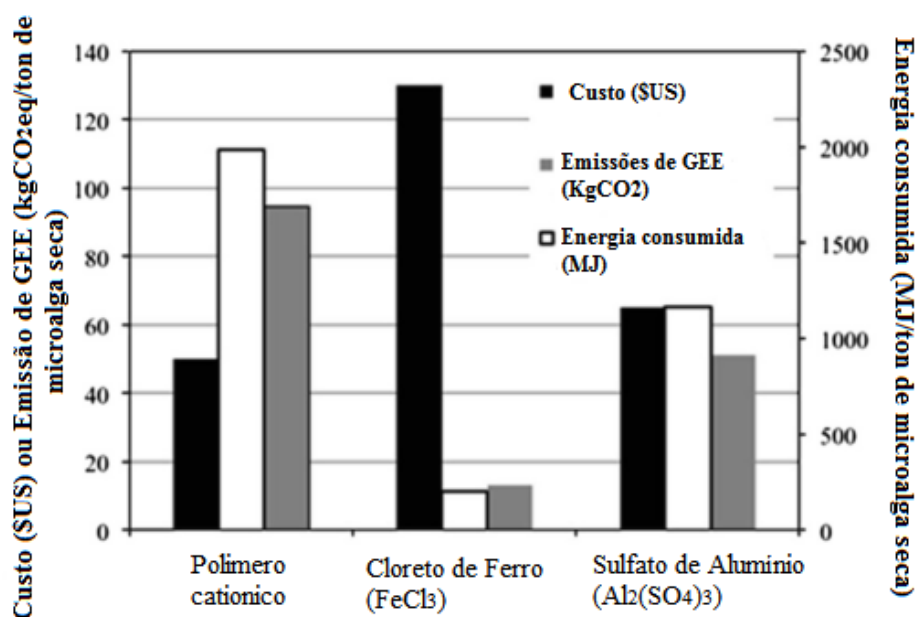


Figura 18 - Custo (\$US), emissão de GEE e consumo de energia por tonelada de microalga seca para polímero catiónico, cloreto de ferro e sulfato de alumínio. (Udom *et al.* 2013)

Embora o cloreto de ferro seja o floculante que exige menos energia consumida e menos emissões de GEE, apresenta-se como o mais dispendioso. O polímero catiónico revela ser o floculante menos dispendioso, mas a sua produção e consumo exigem mais consumo energético e maiores emissões de GEE que o sulfato de alumínio, que continua a ser o floculante mais citado na bibliografia e o mais utilizado em estudos de produção de biomassa (Ramalho 2013).

Outros polímeros naturais têm sido investigados para a utilização como floculantes para a colheita de microalgas. A quitosana tem-se revelado um coagulante bastante promissor. Ahmad *et al.* (2011) estudaram a otimização deste processo e conseguiram atingir uma recolha de 99% de *Chlorella* sp. com 10mg/L de dosagem de floculante. Divakaran e Pillai (2002) já tinham conseguido, na recolha de *Spirulina* sp., *Oscillatoria* sp. e *Chlorella* sp., eficiências superiores a 90% com uma concentração de 15mg/L e o valor de pH de 7,0. A utilização de biofloculantes pode trazer vantagens, pois possibilita a recirculação das escorrências deste processo e consegue mitigar a presença de contaminantes no produto final (Ahmad *et al.* 2011; Beach *et al.* 2012).

Beach *et al.* (2012) quiseram avaliar os impactos do uso de quitosana como floculante. Realizaram uma ACV através do *software* de modelação SimaPro 7.3 e compararam com outras formas de colheita, nomeadamente centrifugação e sulfato de ferro, obtendo o melhor resultado em todas as categorias avaliadas (emissão de GEE, eutrofização e consumo energético). Contudo o preço por quilograma de quitosana é ainda demasiado alto para ser utilizado como fase integrante da produção de biocombustíveis. A sua utilização irá ter um impacto direto no preço por litro de biocombustível produzido.

4.7.1.2. Flotação

A flotação é um processo de separação sólido-líquido bastante utilizado no tratamento de águas, e é conseguido através da dispersão de microbolhas que arrastam consigo a biomassa até à superfície, onde é posteriormente recolhida com o auxílio de uma ponte raspadora. Este processo não dispensa a adição de floculantes e requer maiores *inputs* energéticos, quer na utilização de ar, quer na ponte raspadora. A flotação é mencionada como um processo possível para a recolha da biomassa, contudo por possuir mais custos que a floculação e decantação não é muito utilizado, e normalmente é preterido em relação a estes.

4.7.2. Espessamento/Secagem

Esta fase do processo tem como objetivo remover a humidade presente na biomassa algal. A eficiência deste processo está dependente do destino da biomassa. Se for utilizado o processo de liquefação hidrotermal (HTL) para produção de biodiesel, a concentração final de biomassa necessita de se encontrar no intervalo 5-20% (López Barreiro *et al.* 2013), por outro lado se for utilizado o processo clássico de transesterificação a concentração necessita de se encontrar nos 90%.

Para atingir as concentrações pretendidas, pode ser utilizada a filtração por vácuo, filtração por membrana, centrifugação, filtro de prensas ou leitos de secagem. Esta fase do processo requer mais energia que a fase da colheita, exceto para os leitos de secagem (Brennan e Owende 2010; Udom *et al.* 2013).

A tabela 10 apresenta o conteúdo final de sólidos após secagem para diferentes métodos de secagem da biomassa. O método mais utilizado industrialmente é o filtro de prensas, por ser um equipamento robusto e com uma grande eficiência. Contudo, pode apresentar algumas desvantagens em relação aos *inputs* energéticos e manutenção.

A filtração por vácuo é um processo de separação que se encontra limitado pela dimensão das células das microalgas, não é aconselhado para células inferiores a 30 µm como é o caso das espécies dos géneros *Scenedesmus*, *Dunaliella* e *Chlorella*. Para as dimensões destas espécies pode ser

utilizada a filtração por membrana, mas para volumes superiores a dois m³, a centrifugação pode ser mais eficiente (Brennan e Owende 2010).

Tabela 10- Comparação de diversos processos de secagem da biomassa (adaptado de Udom *et al.* 2013)

Tecnologia de secagem	Conteúdo de sólidos antes da secagem (%)	Conteúdo de sólidos após secagem (%)
Centrifugação	0,1 - 6	5 – 30
Leitos de secagem	4	30 – 40
Filtros de prensa	0,1 – 35	10 – 90
Filtração por vácuo	0,1	30

O processo de secagem é, a par da utilização de fotobiorreactores tubulares, o processo mais dispendioso energeticamente, e por isso a sua escolha deve ser criteriosa e tendo em conta o processo de extração e conversão que se irá usar de seguida.

Udom *et al.* (2013) realizaram uma ACV dos dois processos de secagem mais utilizados (filtros de prensa e centrifugação) e compararam com a secagem em leitos de secagem. Os resultados são apresentados na figura 19, onde aqueles autores verificaram que o melhor processo são os leitos de secagem. Contudo, a secagem por este processo está dependente das condições atmosféricas e dificilmente se obtêm elevadas concentrações finais de sólidos em tempo útil, para além de ocorrer a perda de biomassa. A utilização de filtros de prensa é aconselhada por ter menos emissões de GEE e menos energia consumida do que a centrifugação, que é desaconselhada a não ser que o processo assim o exija.

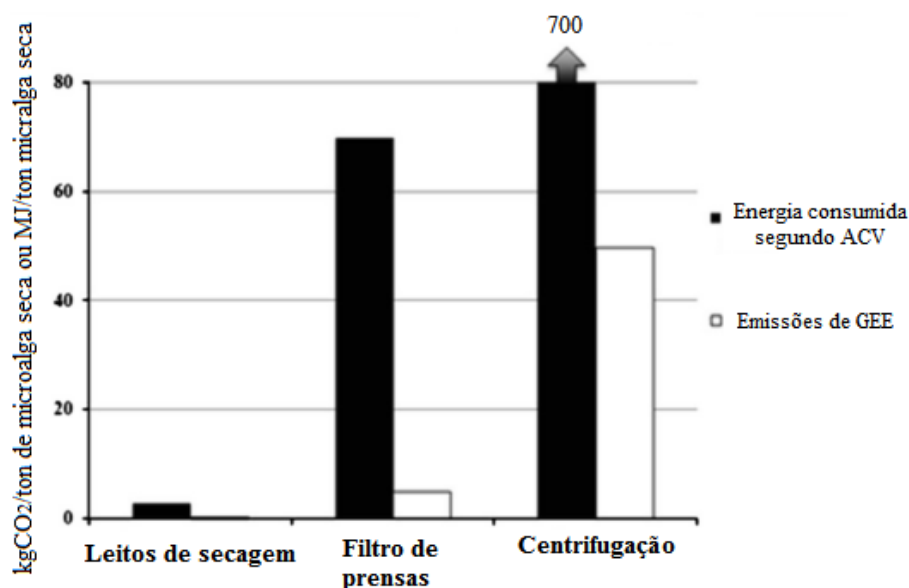


Figura 19 - Energia consumida e emissões de GEE para algumas tecnologias de secagem. (Udom *et al.* 2013).

A energia despendida no processo de espessamento/secagem pode ser reduzida quando não se utiliza o processo clássico de transesterificação. A transesterificação direta e a HTL são processos que não necessitam de uma elevada concentração de sólidos e por isso podem dispensar o processo de secagem, pois a biomassa necessita apenas de ser espessada até determinada concentração.

4.8. Extração do conteúdo lipídico

Esta etapa do processo de produção tem como objetivo a extração do conteúdo lipídico das células. Visto esta etapa ter uma influência direta na eficiência final de produção, os estudos acerca da extração dos óleos de microalgas para a produção de biodiesel, têm suscitado cada vez maior interesse. Apesar disso, ainda se verifica alguma dificuldade na extrapolação dos dados laboratoriais para instalações industriais (Brennan e Owende 2010; Halim *et al.* 2012).

A presença de membrana celular nas microalgas torna extremamente difícil a extração dos lípidos do seu interior, e por isso, antes de ser feita a extração, a biomassa precisa de passar por um processo que provoque a lise celular (Brennan e Owende 2010).

Quando ocorre a lise celular, o conteúdo lipídico da célula é libertado, ficando livre para reagir com o solvente. Quanto maior for a eficiência do processo de lise celular, maior será a eficiência da extração, pois esta já não se encontra restrita pela permeabilidade da membrana celular. De entre as várias metodologias possíveis para a destruição das células, de referir a utilização de micro-ondas, ultrassons e campos eletromagnéticos (*Pulse electric field*), estes sistemas possuem uma grande eficiência (Halim *et al.* 2012; Peralta-Ruiz *et al.* 2013).

Conforme a escolha do processo de extração, a biomassa algal necessita de se encontrar mais, ou menos seca. Se for utilizado o método clássico de extração por solvente orgânico exige-se que a biomassa passe por um processo de secagem intensivo (cerca de 90% de concentração de biomassa), se for utilizada a extração por fluido supercrítico, não é necessário uma secagem intensiva da biomassa. Dessa forma, podemos dividir a extração do conteúdo lipídico em dois grandes grupos. A extração seca (mecânica ou por solvente) ou extração húmida (CO₂ supercrítico). A extração mecânica não foi abordada no presente trabalho pois a sua utilização encontra-se direcionada para a extração de lípidos de oleaginosas terrestres.

4.8.1. Extração por solventes orgânicos

Após o processo de lise celular e secagem é realizada a extração por solvente orgânico. Neste processo, o solvente é misturado à biomassa algal, irá ligar-se com os lípidos e arrasta-os consigo. Posteriormente à mistura, é feita uma separação sólido-líquido, de forma a retirar a fração não lipídica (resíduos que podem ser utilizados para produção energética através de fermentação). Após esta separação é feita a separação do solvente dos lípidos, recolha dos mesmos e aproveitamento do solvente.

Podem ser utilizados vários tipos de solventes para a extração do óleo, o hexano e o etanol são os mais utilizados e referenciados na bibliografia (Chisti 2007; Brennan e Owende 2010; Halim *et al.* 2012).

A escolha do solvente a utilizar deve ser influenciada pelo seu preço, alta seletividade e impactos que tem no meio ambiente.

Halim *et al.* (2012) afirmam que para reduzir a energia necessária para a refinação final do biodiesel, o solvente utilizado deve ser o mais seletivo possível, ou seja, deve arrastar consigo apenas os lípidos. Por exemplo: devido à fraca seletividade do etanol, quando este é utilizado como solvente, é comum encontrarem-se outros componentes como açúcares, pigmentos ou aminoácidos (Peralta-Ruiz *et al.* 2013).

A extração por solvente também pode ser realizada pelo método de Bligh e Dyer (1959) onde é utilizada uma mistura de clorofórmio e metanol. Este método, apesar de ser eficaz, não é aconselhado a nível industrial devido à toxicidade dos solventes utilizados.

O hexano é mais barato em relação a outros solventes polares, a sua recuperação após extração dos lípidos é fácil, existe a possibilidade de ser misturado com isopropanol, esta mistura é considerada industrialmente segura e é utilizada para a extração dos óleos de soja e para além disso, o hexano possui uma boa seletividade lipídica (Peralta-Ruiz *et al.* 2013).

Segundo Lardon *et al.* (2009) a extração do óleo é feita em contracorrente e normalmente são utilizados dois gramas de hexano por cada quilograma de biomassa algal.

Peralta-Ruiz *et al.* (2013) realizaram um estudo onde avaliaram a eficiência exergética e o total de irreversíveis por três sistemas diferentes de extração por solvente, aplicados à escala industrial. Hexano (EH), mistura de hexano e etanol (EHE) e mistura de metanol e clorofórmio (EMC).

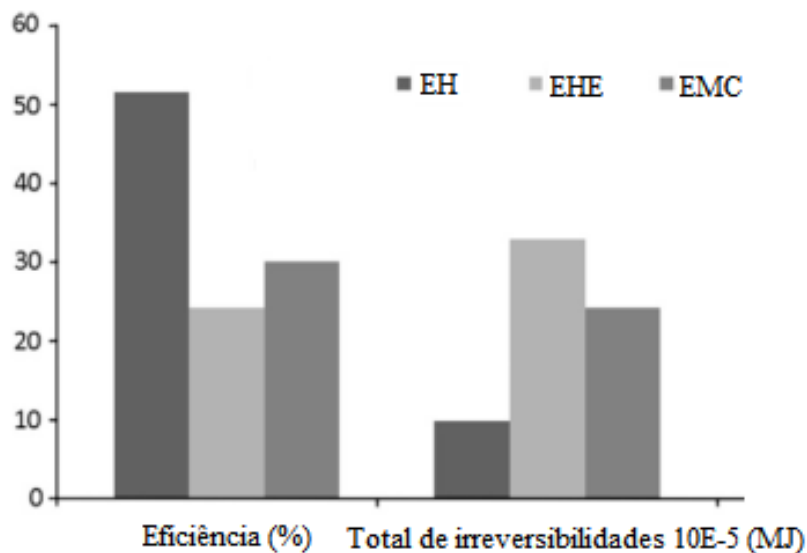


Figura 20 – Eficiência exergética e total de irreversibilidades da utilização de três solventes diferentes na extração de 100000 toneladas de biodiesel/ano. (Peralta-Ruiz *et al.* (2013))

Como é possível verificar na figura 20, o método de extração por hexano leva vantagem em relação aos outros métodos, quer na eficiência exergética, quer no total de irreversibilidades. De seguida é apresentado o fluxograma da extração de lípidos por hexano.

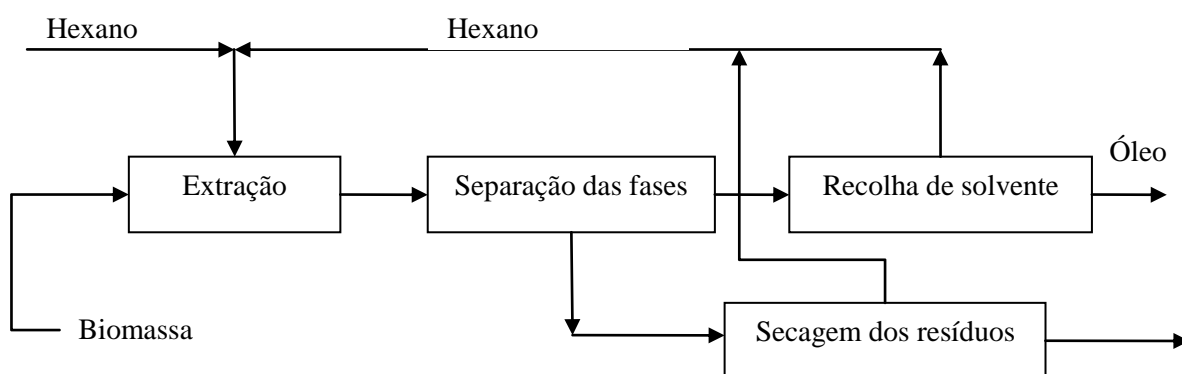


Figura 21 – Fluxograma da extração do conteúdo lipídico por hexano (adaptado de Peralta-Ruiz *et al.* 2013)

4.8.2. Extração por CO₂ supercrítico

A extração por fluido supercrítico é uma tecnologia emergente que tem potencialidade para substituir a tradicional extração por solventes orgânicos.

Diz-se que um fluido se encontra na região supercrítica quando é elevado acima dos valores críticos de temperatura e pressão, adquirindo propriedades físicas entre o estado gasoso e o estado líquido.

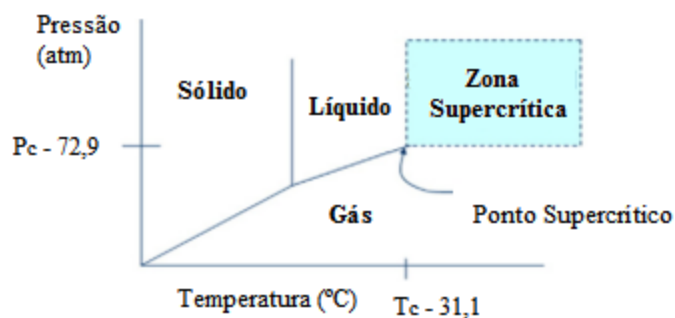


Figura 22 – Diagrama de fases referente ao CO₂. (Halim *et al.* 2012)

Embora a utilização de CO₂ supercrítico (CO₂SC) como solvente exija uma pressão crítica moderada (72,9 atm) o que acarreta elevados custos de compressão, possui uma temperatura crítica baixa (31,1 °C), o que possibilita a extração dos lípidos sem que haja degradação térmica dos mesmos (Halim *et al.* 2012).

A extração por CO₂SC possui como principais vantagens (Halim *et al.* 2012):

- Não necessita de um processo de secagem intensivo nem de pré-tratamento antes da extração (lise celular). Contudo, alguns estudos mostram que a lise celular realizada *a priori* aumentará a eficiência do processo.
- Sintonização do poder do solvente: O poder solvente de um fluido supercrítico é função da sua densidade, que pode ser continuamente ajustada através da pressão e temperatura de extração.
- O facto de o CO₂SC possuir propriedades de transição entre o líquido e o gás possibilita uma maior e mais rápida penetração do solvente no interior da célula. Isto permite uma maior taxa de extração num período de tempo menor.
- Não necessita de recuperação do solvente, pois após a extração dos lípidos, o CO₂SC evapora deixando o conteúdo lipídico livre de solvente.
- Pode ser utilizado o CO₂ proveniente de centrais térmicas, sem a dispensa de equipamento que possibilite a sua utilização.

Apesar das vantagens referidas, este processo ainda requer um custo de investimento extremamente elevado e necessita de grandes quantidades de energia para funcionar. A extrapolação dos dados para instalações industriais é difícil e ainda não se encontra comprovada a sua viabilidade económica.

Halim *et al.* (2012) realizaram um estudo onde compararam a qualidade dos lípidos extraídos através dos processos de extração por hexano e extração através de CO₂SC.

Como podemos verificar através dos resultados obtidos por aqueles autores (figura 23) a extração através de CO₂SC obtém uma maior percentagem da cadeia oleica C18:1, que a extração por hexano. Esta seletividade é bastante benéfica, pois a cadeia lipídica C18:1 é altamente desejável para a produção de biodiesel. De referir também, que a utilização de CO₂SC obteve menor extração de ácido linoleico, que segundo a norma europeia de qualidade dos biocombustíveis EN14214 não deve ser superior a 12%.

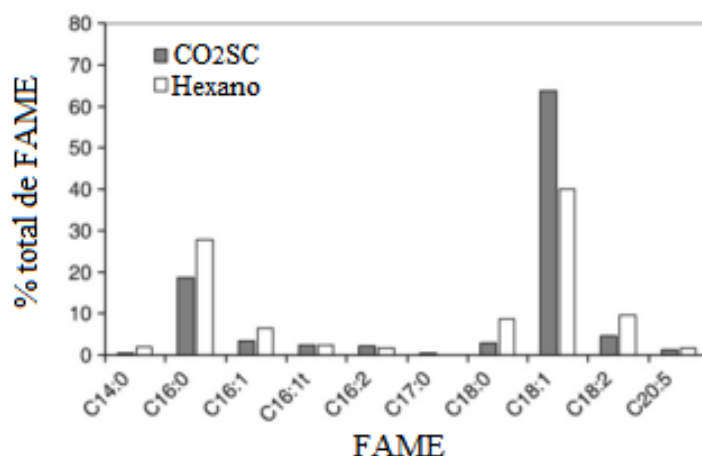


Figura 23 – Composição dos ácidos gordos segundo a extração utilizada. (Halim *et al.* 2012)

4.9.Métodos de conversão do óleo em biodiesel

Após a extração do conteúdo lipídico, é necessária a sua conversão a biodiesel. O processo mais utilizado industrialmente é a transesterificação e segue-se à extração (húmida ou seca) dos lípidos. Este processo, consiste na reação de um triacilglicerol (TAG) com um álcool na presença de um ácido ou base forte (o catalisador pode também ser enzimático), produzindo uma mistura de ésteres metílicos de ácidos gordos, e glicerol (Figura 24). Podem ser usados vários tipos de álcool, mas o mais comum é o metanol principalmente pelo seu baixo custo, contudo, uma das desvantagens da utilização de metanol prende-se no facto de este, normalmente, derivar de combustíveis fósseis. A utilização de bioetanol como substituto do metanol pode reduzir a dependência do processo das fontes fósseis.

O catalisador normalmente é uma base, que torna o processo mais rápido, contudo por vezes pode ocorrer o processo de saponificação. O uso de ácido como catalisador torna a reação mais lenta, traduzindo-se numa maior quantidade de *inputs* energéticos (Franco *et al.* 2013).

No geral este processo é uma sequência de três reações, onde os mono e diacilgliceróis são formados como intermediários.

Para uma reação estequiometricamente completa é necessária uma proporção molar 1:3 (TAG:álcool). Devido ao caráter reversível desta reação, o agente transesterificante (álcool) é adicionado em excesso. Desta forma aumentamos o rendimento da reação bem como favorecemos a separação dos ésteres do glicerol (Knothe 2001; Geris *et al.* 2007).

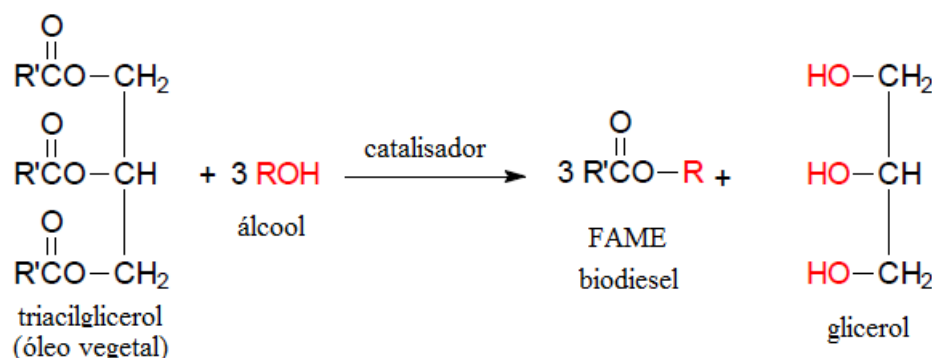


Figura 24 – Reação de transesterificação. (Knothe 2001).

Para além do processo clássico de transesterificação, a conversão pode ser feita a partir de transesterificação direta ou *in situ*, este processo é realizado através de metanol supercrítico (MSC), e à semelhança da extração por CO₂SC utiliza altas pressões e temperaturas, mas neste caso, para além se ser realizada a extração é também realizada a transesterificação.

Brentner *et al.* (2011) afirmam que a transesterificação direta através de MSC pode trazer vantagens. A sua aplicação é feita à biomassa húmida, e por isso é dispensado o processo de secagem e extração lipídica. O facto de este processo combinar as duas fases do processo traz claras vantagens na produção de biodiesel, nomeadamente na poupança de equipamentos. Este é também um processo mais seletivo e com menos produção de resíduos comparativamente aos métodos convencionais. Apesar de tudo, os autores referem que esta tecnologia ainda não é utilizada a nível industrial, devido aos impactes energéticos relativamente elevados para se conseguir atingir as elevadas pressões e temperaturas necessárias para se atingir a zona supercrítica do metanol.

4.9.1. Liquefação hidrotermal

Durante as ultimas décadas a I&D na produção de biocombustíveis a partir de microalgas tem-se focado sobretudo na escolha da espécie de microalga com maior produção lipídica e percentagem de TAG, e na otimização da cultura e colheita. Pouco tem sido investido em novos processos de conversão do óleo em biocombustíveis.

A metodologia convencional para a produção de biocombustíveis a partir de microalgas passa pela escolha de uma espécie com alto teor lipídico para, após colheita ser realizado o processo de secagem, extração por solvente das frações lipídicas e finalmente transesterificação. Estes processos reduzem a eficiência ambiental do sistema, consomem energia e necessitam de solventes orgânicos que prejudicam o meio ambiente.

Com o intuito de simplificar o processo de conversão de biomassa em biodiesel, pode ser aplicado o processo de liquefação hidrotermal (HTL). A HTL é um processo de conversão sólido-líquido através de água a altas temperaturas (280 a 370 °C) e altas pressões (10 a 35 MPa), onde o principal produto desta reação é o bio-crude. Nesta reação também é produzida uma fase gasosa e outra aquosa. Este bio crude possui um valor energético idêntico ao do crude fóssil, contudo não se encontra imediatamente disponível para utilização e necessita de passar por um processo de refinação (López Barreiro *et al.* 2013)

A utilização deste processo evita a necessidade de secagem e extração do óleo, e não necessita da adição de reagentes. Verifica-se que a combustão deste biodiesel possui menos emissões de enxofre e partículas, contudo mostra emissões mais elevadas de NO_x, principalmente devido à grande quantidade de azoto presente na clorofila e nas proteínas, que a par dos elevados custos de construção e operação, é um dos entraves à utilização deste processo (López Barreiro *et al.* 2013)

Com o intuito de comparar os dois processos de produção de conversão da biomassa em biodiesel Boer *et al.* (2012) realizaram um balanço energético de dois cenários, um em que é utilizado o processo clássico de transesterificação e outro onde é utilizada a tecnologia de HTL. A descrição e consumo energético de cada cenário são apresentados de seguida.

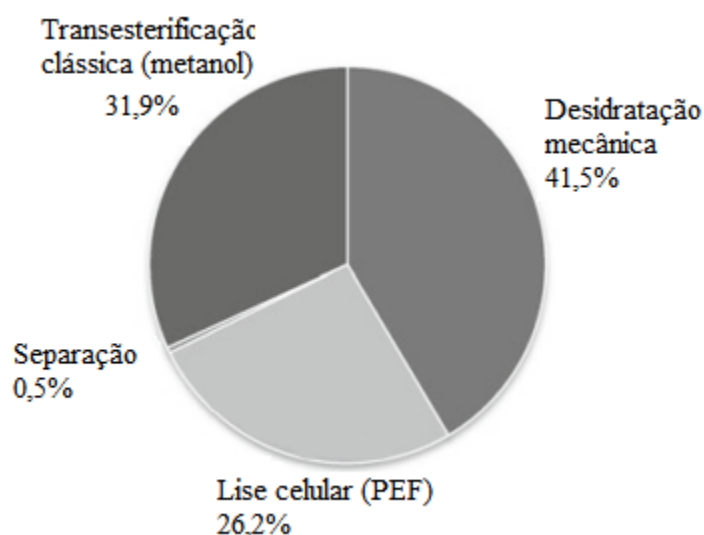


Figura 25 – Diagrama energético da conversão da biomassa em biodiesel usando transesterificação. (Boer *et al.* 2012)

Na figura 25, podemos observar o diagrama energético da conversão da biomassa em biodiesel. Foi utilizada desidratação mecânica da biomassa algal até 25% de concentração de sólidos e depois foi utilizado o processo de impulsos eletromagnéticos (PEF) para provocar a lise celular. Para além de se realizar a transesterificação dos óleos, também foi realizada a digestão anaeróbia dos resíduos provenientes do processo de forma a aumentar a eficiência energética do processo. O balanço energético é apresentado na tabela seguinte.

Tabela 11 – Balanço energético da produção de biodiesel utilizando transesterificação e digestão anaeróbia dos resíduos. (Boer *et al.* 2012)

Operação	Energia (MJ)
Desidratação mecânica	-1140
Lise celular (PEF)	-720
Separação auxiliada por centrifugação	-12,7
Transesterificação	-875
Digestão anaeróbia dos resíduos	6121,3
Energia no biodiesel	7875,0
Total	11248,2

Posteriormente foi realizada a mesma análise mas para a utilização da HTL para a produção de biodiesel.

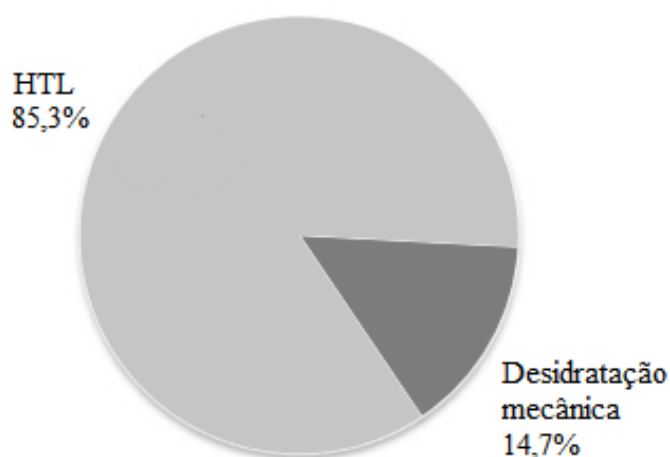


Figura 26 – Diagrama energético da conversão da biomassa em biodiesel usando HTL. (Boer *et al.* 2012)

Neste método de conversão foi realizada a desidratação mecânica tal como no outro processo e depois foi utilizada a liquidificação hidrotermal. Os resultados apresentados na tabela 12 mostram que este cenário é energeticamente positivo.

Tabela 12 – Balanço energético da produção de biodiesel utilizando HTL. (Boer *et al.* 2012)

Operação	Energia (MJ)
Desidratação mecânica	-1140
HTL	-6598
Biocrude leve	12221
Biocrude pesado	4778
Total	9261

Embora a utilização de HTL para a produção de biocombustíveis possua vantagens e seja energeticamente exequível, possui duas grandes desvantagens que necessitam ser ultrapassadas, para que esta seja a tecnologia de eleição para a produção de biodiesel.

A primeira são os elevados custos de instalação e operação deste processo. A segunda é a pouca quantidade de biodiesel produzido. Podemos verificar na tabela 12 que mais de metade da energia produzida por este sistema não é sob a forma de biocombustível (Biocrude pesado). Essencialmente este processo é energeticamente exequível mas a maior parte da energia que podemos retirar dele é sob a forma de calor e eletricidade e não de biodiesel (Boer *et al.* 2012).

Este processo pode ser utilizado numa vertente de aproveitamento dos resíduos provenientes das várias etapas de produção de biocombustíveis, contudo, a energia retirada deste processo pode nunca vir a compensar os custos de instalação (Delrue *et al.* 2013).

4.10. Análise Ciclo de Vida

O desempenho ambiental é importante para avaliar em que medida os impactes ambientais dos biocombustíveis de microalgas são menores do que os impactes dos seus concorrentes de primeira e segunda geração e fósseis.

É a chave para a identificação dos aspetos críticos e das melhores tecnologias do ponto de vista económico-ambiental e serve como guia para a superação das limitações tecnológicas.

Ao longo dos anos têm sido propostos vários indicadores para avaliar o desempenho ambiental dos biocombustíveis. De entre muitos, de realçar a emissão de GEE, emissão de partículas PM₁₀ e PM_{2,5}, balanço energético (*inputs* e *outputs*), o consumo de recursos naturais não renováveis, água, alterações no uso e propriedades do solo, impactes na biodiversidade e eutrofização (Razon e Tan 2011; Franco *et al.* 2013).

De entre a multiplicidade de metodologias de desempenho ambiental existentes, a ACV é aquela que se destaca. A ACV é uma ferramenta especificada pelas normas ISO14040 a 14044 que se enquadra no âmbito da ecologia industrial, sendo definida por uma técnica que tem por objetivo

quantificar os impactos associados a determinado produto ou serviço, compreendendo todas as etapas da sua vida, desde a extração da matéria-prima até à deposição final dos resíduos (*from cradle to grave*), (Franco *et al.* 2013).

Devido à grande variedade de matérias-primas para produção de biodiesel, juntamente com os debates acerca dos potenciais benefícios ambientais finais ou desvantagens de tais sistemas, a ACV tem sido apontada como uma ferramenta útil para a análise e comparação de várias tecnologias de produção de biodiesel (Clarens *et al.* 2010)

A ACV possibilita a análise e comparação dos diferentes métodos utilizados em cada etapa na produção de biodiesel a partir de microalgas, identificando quais as etapas mais penalizadoras no desempenho ambiental. Para além da ACV, os balanços energéticos são bastante importantes, na medida em que permitem avaliar a viabilidade energética do processo.

Lardon *et al.* (2009) estudaram o balanço energético e os impactos ambientais de diferentes cenários para a produção de biodiesel a partir de microalgas. Os resultados foram baseados em dados laboratoriais, extrapolados para instalações comerciais. O método que obteve melhores resultados ambientais na ACV foi a cultura em privação de azoto e extração húmida dos óleos. Estes resultados foram então comparados com o biodiesel proveniente de colza, soja, palma e com o *diesel* fóssil (Figura 27).

Comparativamente, a produção de biodiesel a partir de microalgas revelou ser a pior opção nos indicadores radiação ionizante, oxidação fotoquímica e toxicidade marinha e a segunda pior no indicador esgotamento de recursos abióticos. Revelou resultados positivos nas outras categorias e de notar, os resultados obtidos para eutrofização e uso e alteração do solo. Podem ser obtidos melhores resultados para os indicadores eutrofização e toxicidade humana se forem utilizadas águas residuais na produção de biomassa. Essa hipótese não foi avaliada nesse estudo.

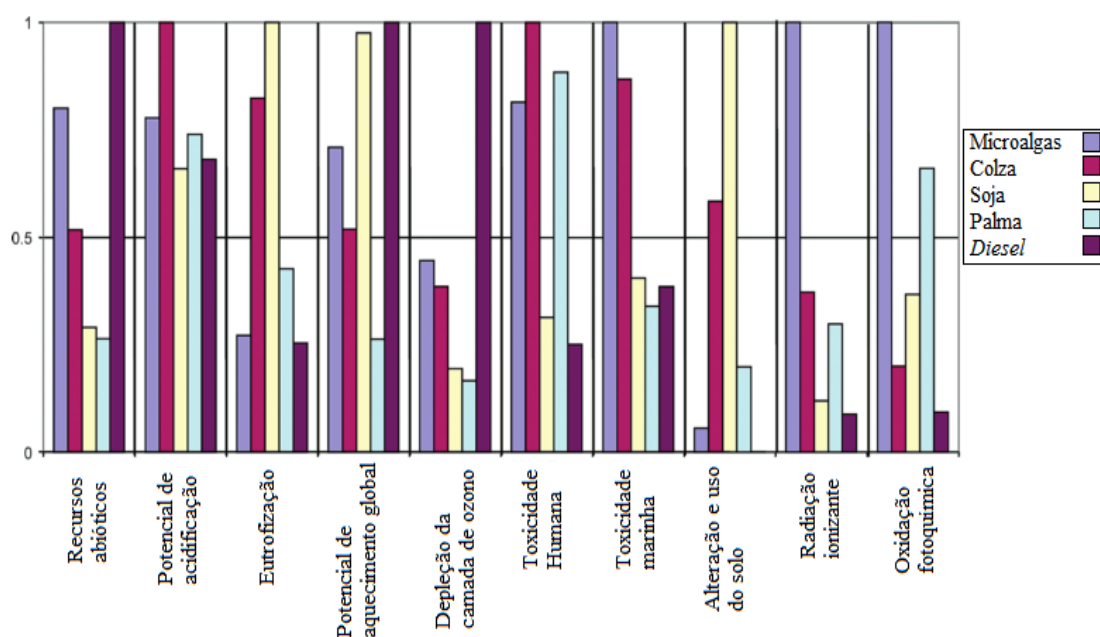


Figura 27 – Comparação dos impactos causados pela produção de um MJ a partir de diversas fontes de biodiesel e diesel fossil. (Lardon *et al.* 2009)

Numa avaliação global, podemos concluir que o desempenho ambiental da produção de biodiesel a partir de microalgas, não é muito melhor do que os seus concorrentes terrestres. Contudo, os últimos avanços, nesta tecnologia ainda em fase de maturação, têm conseguido aumentar a eficiência do processo.

O melhor controlo da energia despendida no processo, não só melhora o balanço energético final como pode também reduzir os impactos verificados na depleção da camada de ozono, potencial de aquecimento global e depleção de recursos abióticos (Lardon *et al.* 2009).

De forma a avaliar o impacto que tem a eficiência energética e o uso de resíduos como matéria-prima Soratana *et al.* (2012) realizaram uma ACV comparativa, onde analisaram quatro cenários diferentes. Baixa eficiência usando recursos sintéticos (BRS), baixa eficiência usando recursos naturais (BRN), alta eficiência usando recursos sintéticos (ARS) e alta eficiência usando recursos naturais (ARN), em todos os cenários foi assumido o cultivo em fotobiorreactores. A caracterização dos diferentes cenários é apresentada na tabela seguinte.

Tabela 13 – Caracterização dos diferentes cenários. (Soratana *et al.* 2012)

	Conteúdo lipídico (%)	Meio de cultura e provisão de nutrientes	Floculante $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ + filtro de prensas (%)	Secagem	Extração por solvente Hexano (%)	Transesterificação NaOH + Metanol (%)
BRS	50	<ul style="list-style-type: none"> • Água potável • Ureia • Fosfato monocálcio • Cloreto de potássio 	72	Filtro de prensas	78	70
ARS	70	<ul style="list-style-type: none"> • CO_2 sintético • Iluminação artificial 	90	Filtro de prensas	98	87
BRN	50	<ul style="list-style-type: none"> • Águas residuais • Cloreto de potássio • CO_2 de gases de combustão 	72	Solar	78	70
ARN	70	<ul style="list-style-type: none"> • Luz solar 	90	Solar	98	87

Após a definição dos cenários, os autores avaliaram os impactos ambientais de cada etapa do processo de produção de uma unidade funcional ($8,94 \times 10^{10}$ MJ/ano) em 10 indicadores diferentes: Potencial de aquecimento global (PAG), acidificação (AC), efeitos carcinogénicos (EC), efeitos não carcinogénicos (ENC), efeitos respiratórios (ER), eutrofização (E), depleção da camada de ozono (DCO), ecotoxicidade terrestre (ET), formação de *smog* (FS) e utilização de energia não renovável (UENR).

Os resultados foram normalizados em relação ao cenário BRS que se revelou ser o pior em todas as categorias, como seria esperado. Os resultados são apresentados nas figuras 28 e 29.

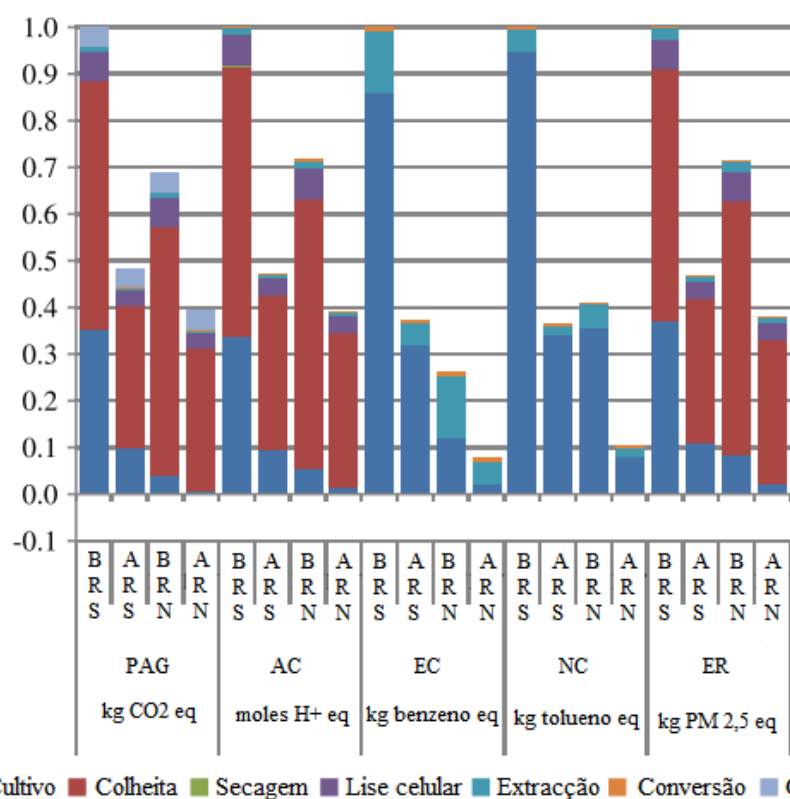


Figura 28 - Resultados da avaliação de impactos ambientais para os 4 cenários normalizados na produção de uma unidade funcional (Soratana *et al.* 2012).

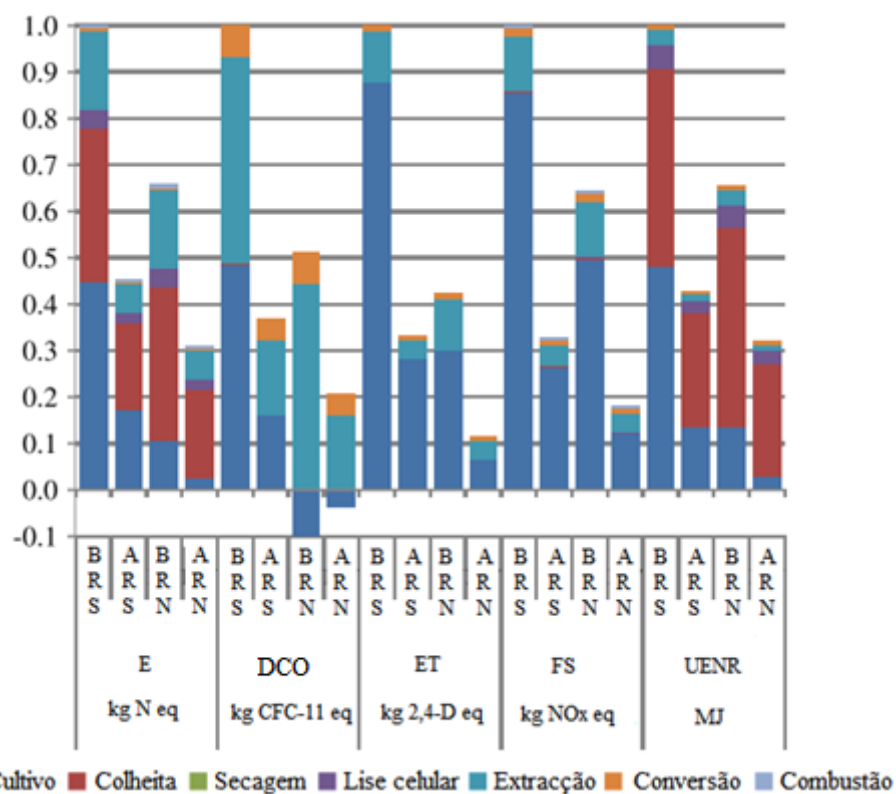


Figura 29 – Resultados da avaliação de impactos ambientais para os 4 cenários normalizados na produção de uma unidade funcional (Soratana *et al.* 2012).

Analisando as figura 28 e 29, chegamos à conclusão que tal como referido por Lardon *et al.* (2009), quando aumenta a eficiência dos processos, aumenta também o desempenho ambiental, e daí os melhores cenários serem os de alta eficiência (ARS e ARN). Contudo, os cenários ARS e ARN são demasiado otimistas.

Analisando os outros dois cenários mais conservativos, os autores concluíram que a utilização de recursos naturais (BRN) diminui consideravelmente os impactes no ambiente.

A etapa da colheita contribui significativamente para 5 dos 10 indicadores avaliados, porém o estudo de Beach *et al.* (2012), já referido na presente dissertação, mostrou possíveis melhorias nos indicadores PAG, E e UENIR, substituindo o floculante sulfato de alumínio pelo biofloculante quitosana.

Delrue *et al.* (2013) incorporaram as equações de balanço de massa e energia num modelo computacional estatístico, para avaliar a eficiência energética, o custo de produção e a emissão de gases de efeito estufa de diversos processos de produção de biodiesel, a partir de microalgas.

A cada parâmetro do modelo é atribuído um valor máximo e mínimo. O objetivo destes intervalos é considerar que existem incertezas nos valores reais, devido a aumentos na escala do processo e ao desenvolvimento tecnológico.

Cada vez que o modelo é utilizado para caracterizar um determinado processo são obtidos 25000 resultados que provêm da combinação de valores de cada parâmetro. Estes resultados são agrupados segundo a sua ocorrência e o intervalo $Y_{25\%} - Y_{75\%}$ representa o intervalo onde se encontram 50% dos resultados (Tabela 13) (Delrue *et al.* 2012).

$Y_{25\%}$ - 25% dos resultados obtidos encontram-se abaixo deste valor.

$Y_{75\%}$ - 75% dos resultados obtidos encontram-se abaixo deste valor.

Neste trabalho, os autores avaliaram três principais métodos de produção. Biodiesel com extração húmida, transesterificação e digestão anaeróbia dos resíduos (BT), biodiesel utilizando HTL (BH) e biodiesel com extração húmida, transesterificação e HTL dos resíduos (BTBH). Para além destes três métodos, foram ainda avaliados dois processos descritos de seguida.

Existem espécies de microalgas, como a *Botryococcus braunii* capazes de realizar a secreção de óleos diretamente para o meio de cultura. Visto o conteúdo lipídico se encontrar diretamente disponível no meio de cultura, é necessário apenas um processo de separação líquido-líquido e posterior transesterificação do óleo recolhido, dispensando assim o processo de extração da biomassa e dos lípidos (BSE). Os autores realizaram ainda uma análise à situação hipotética em que todo o óleo excretado para o meio de cultura não necessita de transesterificação e está disponível para ser utilizado (BSEC) (Delrue *et al.* 2013).

Contudo, as microalgas capazes de realizar a secreção de lípidos possuem baixa produtividade. Para além disso os lípidos por se encontrarem dispersos no meio de cultura estão disponíveis para

absorção por bactérias ou fungos, por isso neste caso, o uso de fotobiorreactores tubulares é obrigatório para evitar contaminações do meio de cultura.

Tabela 14 – Resultados do modelo em comparação com o *diesel* fóssil (adaptado de Delrue *et al.* 2013).

	Balanço energético (GJ produzido/GJ consumido)			Custo de produção (€/GJ produzido)			GEE (kgCO ₂ /GJ produzido)		
	Y _{25%}	Y _{75%}	Valor médio	Y _{25%}	Y _{75%}	Valor médio	Y _{25%}	Y _{75%}	Valor médio
<i>Diesel</i> fóssil	N.R.	N.R.	4,90	N.R.	N.R.	16,2	N.R.	N.R.	69,4
BT	1,85	2,46	2,18	52,1	90,9	74,8	18,5	26,0	22,5
BH	1,75	2,22	1,99	50,0	77,7	65,9	20,9	27,1	24,3
BTBH	1,43	1,86	1,66	41,8	61,1	52,7	24	33,1	28,9
BSE	2,61	3,28	2,95	58,2	103	84,1	11,9	15,2	13,7
BSEC	3,09	4,18	3,65	55,5	99,6	81	10,6	14,2	12,6

Através da tabela 14 podemos verificar que o custo de produção é ainda demasiado elevado para um balanço energético relativamente baixo, quando comparado com o *diesel* fóssil. Das três alternativas analisadas, o biodiesel com extração húmida é aquele que tem o melhor balanço energético e aquele com melhor desempenho no que diz respeito às emissões de GEE, porém é aquele com maior custo por GJ de energia produzida. De referir os bons resultados obtidos nos custos por GJ de energia produzida, com a adição de HTL dos resíduos provenientes do processo de produção.

Ambas as hipóteses mostraram bons desempenhos no balanço energético e na emissão de GEE, mas preços por GJ de energia produzida consideravelmente mais altos que as outras hipóteses, devido ao uso de fotobiorreactores tubulares.

Esta análise ajuda a identificar os processos de extração e conversão como gargalos tecnológicos na produção de biocombustíveis. Fica também patente o efeito que tem o uso de fotobiorreactores tubulares no custo de produção de energia, mais uma vez mostrando, que este sistema deve encontrar-se vocacionado para a produção de biomassa tendo em vista produtos de valor acrescentado ou então como complemento à produção de biocombustíveis, incluído num conceito de biorefinaria.

5. Contribuição das microalgas para a produção de biodiesel

A Diretiva 2009/28/CE, transposta para a legislação portuguesa através do Decreto-lei nº117/2010 de 25 de outubro, tem como objetivo estabelecer metas e obrigações de incorporação de biocombustíveis no mercado. O artigo 11º do referido decreto-lei diz que “As entidades que incorporem combustíveis no mercado para consumo final no setor dos transportes terrestres, abreviadamente designadas por incorporadores, estão obrigadas a contribuir para o cumprimento das metas de incorporação nas seguintes percentagens de biocombustíveis, em teor energético, relativamente às quantidades de combustíveis por si colocadas no consumo”:

Tabela 15 - Metas de incorporação de biocombustíveis

Anos	Percentagem de incorporação
2013-2014	5%
2015-2016	7,5%
2017-2018	9%
2019-2020	10%

Em relação ao biodiesel para o setor dos transportes terrestres o Decreto-lei nº117/2010 refere no artigo 28º que “Sem prejuízo do disposto no artigo 11º, os incorporadores estão obrigados, até final do corrente ano (2014), a incorporar um valor mínimo de 6,75% em volume de biodiesel no gasóleo utilizado no setor dos transportes terrestres.”

Segundo os dados da Direção Geral de Energia e Geologia (2014) apresentados na tabela 16, podemos verificar que a meta exigida pelo artigo 28º do Decreto-lei nº 117/2010 estava a ser atingida no final de 2013. Contudo, os dados do primeiro mês do presente ano, evidenciam uma redução substancial da incorporação de biodiesel no gasóleo, menos 1,61% que no mesmo mês de 2013.

Tabela 16 – Dados relativamente ao consumo de gasóleo e biodiesel por parte do setor dos transportes durante o ano de 2013 e em janeiro de 2014. Percentagem de incorporação de biodiesel no gasóleo. (adaptado de DGEG 2014).

	Total de 2013	Janeiro 2014
Gasóleo + Biodiesel incorporado (t)	4088388	322380
Biodiesel incorporado no gasóleo (t)	301089	16636
Percentagem de incorporação (%)	7,36	5,16
Biodiesel fornecido diretamente ao mercado (t)	4865	404
Total de biodiesel (t)	305954	17040

De acordo com a bibliografia consultada, até ao momento, em Portugal, não existe contribuição direta das microalgas para a produção de biodiesel a ser utilizado no setor dos transportes. Contudo, já se encontra em funcionamento a produção de biocombustível a partir de microalgas para a produção de eletricidade. No dia 5 de Outubro de 2011 foi inaugurado na ilha de Porto Santo o projeto de produção de biocombustíveis a partir de microalgas. O biocombustível aqui produzido será utilizado como substituto do fuel óleo utilizado na produção de eletricidade da ilha, bastando apenas pequenas adaptações na atual central térmica.

À data, o presidente do Conselho de Administração da Empresa de Eletricidade da Madeira (EEM), afirmou que a central, em ano cruzeiro: “terá capacidade para produzir biocombustível suficiente para substituir o consumo de fuel óleo utilizado na produção de eletricidade...”.

Em termos económicos, além da poupança em aquisições de licenças de emissão de CO₂ na ordem dos 375 mil euros por ano, a região poupará cerca de 4,5 milhões de euros por ano com a redução de importação de combustíveis fósseis. O custo total do investimento foi de 38 milhões de euros e foi apoiado por fundos provenientes da UE em cerca de 15 milhões de euros (Jornal da Madeira 2011).

Com o objetivo de compreender o possível contributo das microalgas na incorporação de biodiesel no setor dos transportes, foi estudada a possível quantidade de biodiesel produzido a partir de microalgas aliado à remoção de nutrientes de águas residuais. Para isso foi utilizado o modelo de Ruiz *et al.* (2013), que propõem a adaptação e aplicação do modelo logístico de Verhulst e Pearl (Gause 1934) a um balanço de massas num sistema de cultura em contínuo. A dedução e explicação da aplicação do modelo são apresentadas no subcapítulo seguinte.

5.1. Dedução do modelo

A maioria dos dados existentes são provenientes de ensaios laboratoriais e culturas de microalgas em descontínuo (*batch*) e por vezes torna-se difícil fazer uma previsão das taxas de crescimento, concentrações máximas e produtividade primária observadas em sistemas contínuos e de porte industrial. Ruiz *et al.* (2013) efetuaram um trabalho onde apresentam um modelo para prevêr a produtividade volumétrica em sistemas contínuos, utilizando dados cinéticos obtidos a partir de culturas de microalgas em descontínuo.

Normalmente é utilizado o modelo logístico de crescimento de Verhulst e Pearl (Gause 1934) para descrever a evolução do crescimento de microalgas em culturas em descontínuo, cuja equação é a seguinte:

$$\frac{\delta X}{\delta t} = \mu \cdot X \left(1 - \frac{X}{X_m}\right) \quad (eq. 1)$$

Onde:

X – Concentração de biomassa (mg/l)

X_m – Concentração máxima de biomassa (mg/l)

μ - Taxa específica de crescimento (dia^{-1})

$\frac{\delta X}{\delta t}$ – Variação da concentração da biomassa em ordem ao tempo (mg/l/dia)

Os parâmetros cinéticos de crescimento obtidos a partir de culturas em descontínuo são importantes, não só para a comparação entre diferentes condições de cultura como também para prever o crescimento e produtividade em culturas contínuas. De forma a estimar a produtividade num reator contínuo com parâmetros cinéticos obtidos de culturas em descontínuo, deve ser realizado um balanço de massas (Ruiz *et al.* 2013).

O balanço de massa para a biomassa no reator é:

$$\frac{\delta m}{\delta t} = m_i - m_f + m_p \quad (eq. 2)$$

onde:

m_i – Biomassa afluenta ao reator (g/dia)

m_f – Biomassa efluente do reator (g/dia)

m_p – Biomassa produzida no reator (g/dia)

$\frac{\delta m}{\delta t}$ – Variação de biomassa no reator (g/dia)

Considerando o reator em condições estacionárias e assumindo que no meio de cultura afluenta não se encontra biomassa algal, a biomassa final é igual à biomassa produzida (eq.3). A equação 4 é deduzida a partir da equação 3.

$$m_f = m_p \quad (eq. 3)$$

$$QX_f = V \left(\frac{\delta X}{\delta t} \right) \quad (eq. 4)$$

onde:

Q – Caudal afluenta (l/dia)

X_f – Concentração de biomassa no efluente (mg/l)

V – Volume do reator (l)

$\frac{\delta X}{\delta t}$ – Variação da concentração no reator em ordem ao tempo (mg/l/dia)

Assumindo que o meio de cultura se encontra homogéneo, podemos afirmar que a concentração de biomassa à saída do reator é igual à concentração de biomassa no interior do mesmo (eq.5).

$$QX = V \left(\frac{\delta X}{\delta t} \right) \quad (eq. 5)$$

Substituindo a equação 1 na equação 5 obtemos a equação 6 que foi simplificada de forma a constar o tempo de retenção hidráulico (θ):

$$X = Xm \left(1 - \frac{1}{\mu \cdot \theta} \right) \quad (eq. 6)$$

onde:

θ – Tempo de retenção hidráulico (dia)

Num reator em contínuo a produtividade volumétrica pode ser calculada através das seguintes expressões:

$$Pv = \frac{mf}{V} = \frac{Q \cdot X}{V} = \frac{X}{\theta} \quad (eq. 7)$$

onde:

Pv – Produtividade volumétrica (mg/l/dia)

Substituindo a equação 6 e 7 conseguimos chegar a uma equação que relaciona a produtividade volumétrica com o tempo de retenção hidráulico e com os parâmetros cinéticos obtidos a partir de culturas em descontínuo.

$$Pv = Xm \left(\theta^{-1} - \frac{1}{\mu} \cdot \theta^{-2} \right) \quad (eq. 8)$$

Assim, segundo Ruiz *et al.* (2013) podemos estimar a produtividade volumétrica a partir de três diferentes variáveis: a concentração máxima de biomassa, a taxa específica de crescimento e o tempo de retenção hidráulico.

A partir da produtividade volumétrica é possível deduzirmos a produtividade primária (mg/m²/dia) a partir da eq. 9.

$$P = P_v \cdot \frac{V}{A} \quad (eq. 9)$$

onde:

P – Produtividade primária (mg/m²/dia)

V – Volume do reator (m³)

A – Área de iluminação (m²)

5.2. Variação da produtividade volumétrica segundo as diferentes variáveis

De forma a compreendermos a relação entre a produtividade volumétrica e as diferentes variáveis do sistema foi analisada a variação da mesma segundo cada uma das variáveis.

5.2.1. Produtividade volumétrica vs. Concentração máxima de biomassa

A figura 30 apresenta a variação da produtividade segundo a concentração máxima de biomassa. A taxa de crescimento e o tempo de retenção hidráulico são constantes. Como podemos verificar existe uma correlação linear entre estes dois parâmetros. Existe esta relação pois a concentração máxima, representa no modelo de Verhulst e Pearl, a capacidade de suporte ou de sustentação do meio.

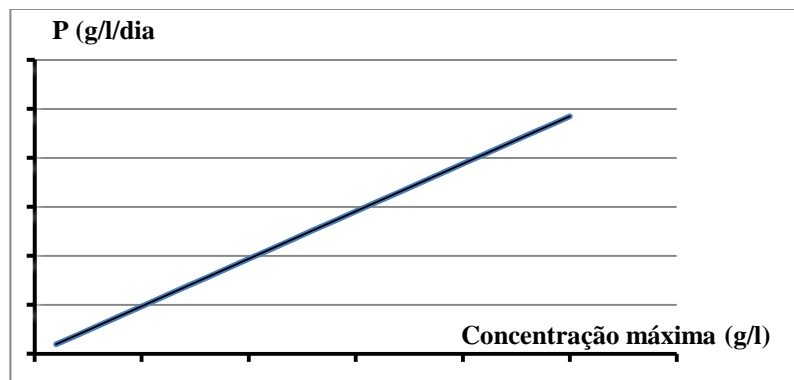


Figura 30 – Variação da produtividade volumétrica em função da concentração máxima.

5.2.2. Produtividade volumétrica vs. Taxa específica de crescimento

A figura 31 representa a variação da produtividade volumétrica em relação à variação da taxa de crescimento. As variáveis concentração máxima e tempo de retenção hidráulico são consideradas constantes. A interseção desta função com o eixo das abcissas, representa o ponto a partir do qual o

sistema deixa de estar em *wash-out*, ou seja, em perda de biomassa algal. O wash-out acontece quando a taxa de crescimento é inferior ao tempo de retenção hidráulico.

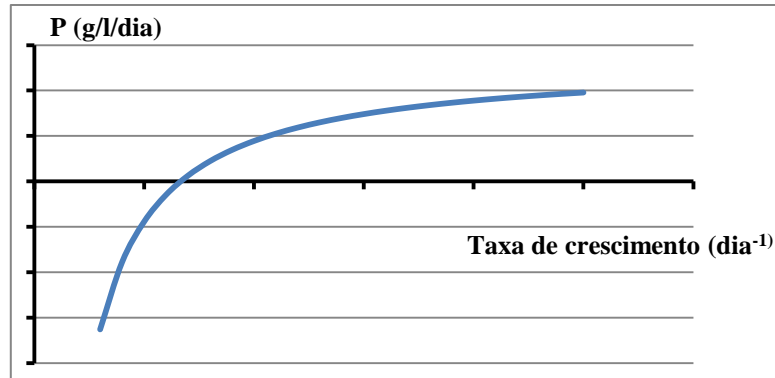


Figura 31 – Variação da produtividade volumétrica em função da taxa de crescimento.

5.2.3. Produtividade volumétrica vs. Tempo de retenção hidráulico

A figura 32 representa a variação da produtividade volumétrica em relação ao tempo de retenção hidráulico. As variáveis concentração máxima e taxa de crescimento são consideradas constantes. Tal como na figura 31, o zero desta função representa o valor em que o tempo de retenção hidráulico é igual à taxa de crescimento e a partir do qual o reator deixa de entrar em *wash-out*.

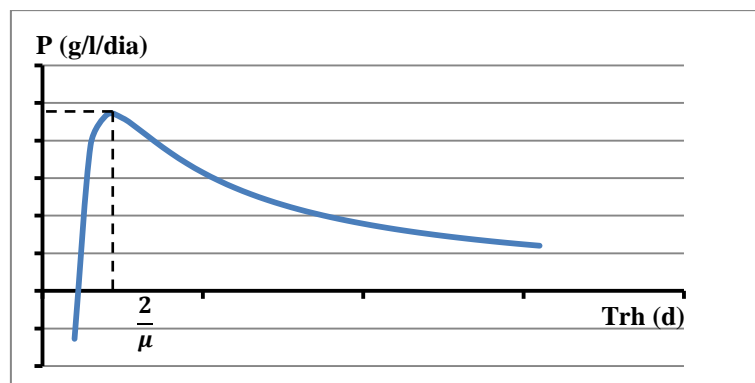


Figura 32 – Variação da produtividade volumétrica em função do tempo de retenção hidráulico.

O tempo de retenção hidráulico para o qual a produtividade volumétrica é máxima pode ser deduzido igualando a derivada da produtividade volumétrica em ordem ao tempo de retenção hidráulico a 0 (eq.10).

$$\frac{\delta P_v}{\delta \theta} = X_m \left(-\theta^{-2} + \frac{2}{\mu} \cdot \theta^{-3} \right) = 0 \quad (eq.10)$$

$$\theta = \frac{2}{\mu} \quad (eq. 11)$$

Usando os parâmetros obtidos a partir de culturas em descontínuo (Concentração máxima de biomassa e taxa específica de crescimento), podemos obter a produtividade volumétrica máxima se optarmos por um tempo de retenção hidráulico igual a $2\mu^{-1}$. O tempo de retenção hidráulico deve ser escolhido conforme o objetivo principal da cultura (remoção de nutrientes ou produção de biomassa algal). Se por exemplo, o objetivo for a remoção de nutrientes deve optar-se por um tempo de retenção hidráulico suficiente para a remoção dos mesmos.

Como podemos verificar na figura 32, existem dois tempos de retenção hidráulico para o mesmo valor de produtividade volumétrica, se o objetivo for a produção de biodiesel deve optar-se pelo maior tempo de retenção hidráulico. Ruiz *et al.* (2013) registraram uma maior percentagem de lípidos na biomassa quando o tempo de retenção hidráulico é maior.

5.3. Apresentação do caso de estudo

Com o objetivo de se calcular o possível contributo da produção de biodiesel de microalgas produzidas em águas residuais, foi idealizada uma estação de tratamento de águas residuais (ETAR) cuja população servida, caudal médio diário (Qmd) e capitações de fósforo total (PT) e azoto total (NT) do efluente são apresentadas na tabela 17.

Tabela 17 – População servida e caracterização do efluente ao bioreactor.

População (hab)	25 000
Capitação (L/hab/dia)	160
Capitação NT (g/hab/dia)	15,0
Capitação PT (g/hab/dia)	2,0
Fator de afluência	0,8
Qmd (m3/dia)	3 200
Carga NT (kg/dia)	375
Carga PT (kg/dia)	50
Concentração NT (mg/l)	117
Concentração PT (mg/l)	16

Segundo o que está disposto no Decreto-Lei nº152/97, as concentrações máximas de descarga permitidas para fósforo total e azoto total em zonas sensíveis, são de 2 mg/l e 15 mg/l, respetivamente. Assim, a quantidade destes nutrientes que terá de ser removida será:

Tabela 18 - Total de azoto e fósforo a ser removido

NT removido (mg/L)	102
PT removido (mg/L)	14

5.3.1. Descrição dos cenários

A microalga proposta para a produção de biodiesel em ambos os cenários foi a *Scenedesmus obliquus*, por duas razões:

- Elevada percentagem de lípidos (Amaro *et al.* 2011).
- Capacidade de se desenvolver em águas residuais e contribuir para a remoção de nutrientes (Ruiz-Marin *et al.* 2010; Ruiz *et al.* 2013).

Foram idealizados dois cenários de produção, um mais conservativo e outro mais otimista. As principais diferenças entre os cenários são a taxa específica de crescimento e as eficiências das etapas no processo de transformação da biomassa algal em biodiesel. Em ambos os cenários foi calculada a produção de biodiesel, tendo em vista o tempo de retenção hidráulico para a remoção de nutrientes que é exigida (Tabela 18) e foi também calculada a produção de biodiesel para o tempo de retenção hidráulico cuja produtividade é máxima, ou seja, tendo em vista a máxima produção de biodiesel.

Em ambos os cenários foram utilizados fotobiorreactores flat-plate, cujas dimensões de cada painel são apresentadas na tabela 19. Este reator foi escolhido, entre outras razões referidas no capítulo 4.7.4.3, pelo facto de se conseguir um maior controlo do meio de cultura e não haver contaminações e, consequentemente, permitir uma aproximação mais fidedigna das previsões obtidas pelo modelo.

Tabela 19 – Dimensões de cada painel do fotobiorreator.

Fotobiorreator Flat-Plate	
Comprimento (m)	2
Altura (m)	4
Largura (m)	0,5
Volume unitário (m³)	4
Área iluminada unitária (m²)	17
Razão Área/Volume (m⁻¹)	4,25

Foi também admitida a mesma capacidade de carga para ambos os cenários, ou seja, foi utilizada a mesma concentração máxima de 2g/l para *Scenedesmus obliquus* referida por Gouveia e Oliveira (2009).

5.3.2. Caracterização do cenário conservativo

Na concepção de um cenário mais conservativo, foi admitida uma taxa específica de crescimento mais baixa reportada por Ruiz-Marin *et al.* (2010). O tempo de retenção hidráulico utilizado para calcular a produtividade volumétrica, foi calculado a partir das taxas de remoção de azoto e fósforo reportadas no mesmo estudo de Ruiz-Marin *et al.* (2010) (Tabela 20).

A produtividade volumétrica foi calculada a partir da eq.8 a produtividade a partir da eq.9 e o tempo de retenção hidráulico para o qual a produtividade é máxima a partir da eq.11. Os dados são apresentados na tabela 20.

Tabela 20 – Parâmetros utilizados no cenário conservativo.

<i>Scenedesmus obliquus</i>		
Parâmetros		Referências
Concentração máxima X_m (g/L)	2	Gouveia e Oliveira 2009
Taxa de crescimento μ (dia ⁻¹)	0,29	Ruiz-Marin <i>et al.</i> 2010
Taxa de remoção NT(mg/L/dia)	20,5	Ruiz-Marin <i>et al.</i> 2010
Taxa de remoção PT (mg/L/dia)	1,04	Ruiz-Marin <i>et al.</i> 2010
θ para remoção de nutrientes (dia)	13,10	-
θ para P_v máxima (dia)	7,02	Eq. 11
P_v remoção de nutrientes (kg/m ³ /dia)	0,11	Eq. 8
P remoção de nutrientes (g/m ² /dia)	0,026	Eq. 9
P_v máxima (kg/m ³ /dia)	0,14	Eq. 8
P máxima (g/m ² /dia)	0,034	Eq. 9

Depois de estimadas as produtividades, foi necessário estabelecer quais os processos utilizados, as suas eficiências e a percentagem lipídica da microalga (Tabela 21). Por estar a ser utilizado um processo mais conservativo, foi utilizado o processo clássico de conversão da biomassa algal em biodiesel, ou seja, colheita por floculação utilizando sulfato de alumínio, lise celular, secagem, extração por hexano e transesterificação.

Tabela 21 – Processos e eficiências utilizadas no cenário conservativo.

Cenário conservativo		Referências
Conteúdo lipídico (%)	29,3	Ruiz <i>et al.</i> 2013
Colheita		Soratana <i>et al.</i> 2012
Floculante	Sulfato de alumínio	
Eficiência (%)	90	
Extração lipídica		Brentner <i>et al.</i> 2011
Método utilizado	Extração por hexano	
Eficiência (%)	91	
Conversão dos lípidos em biodiesel		Soratana <i>et al.</i> 2012
Método utilizado	Transesterificação	
Eficiência (%)	87	

5.3.3. Caracterização do cenário otimista

Na concepção de um cenário mais otimista foi admitida uma taxa específica de crescimento mais alta reportada por Ruiz *et al.* (2013). O tempo de retenção hidráulico utilizado para calcular a produtividade volumétrica, foi calculado a partir das taxas de remoção de azoto e fósforo reportadas no mesmo estudo de Ruiz *et al.* (2013) (Tabela22).

Tabela 22 - Parâmetros utilizados no cenário otimista.

<i>Scenedesmus obliquus</i>		
Parâmetros		Referências
Concentração máxima X_m (g/L)	2	Gouveia e Oliveira 2009
Taxa de crescimento μ (dia ⁻¹)	0,94	Ruiz-Marin <i>et al.</i> 2010
Taxa de remoção NT (mg/L/dia)	13,5	Ruiz-Marin <i>et al.</i> 2010
Taxa de remoção PT (mg/L/dia)	1,49	Ruiz-Marin <i>et al.</i> 2010
θ para remoção de nutrientes (dia)	9,14	-
θ para P_v máxima (dia)	2,1	Eq. 11
P_v remoção de nutrientes (kg/m ³ /dia)	0,19	Eq. 8
P remoção de nutrientes (g/m ² /dia)	0,045	Eq. 9
P_v máxima (kg/m ³ /dia)	0,47	Eq. 8
P máxima (g/m ² /dia)	0,111	Eq. 9

Depois de estarem estimadas as produtividades, foi necessário estabelecer quais os processos utilizados, as suas eficiências e a percentagem lipídica da microalga (Tabela 23). Neste caso foi assumido que o floculante utilizado na colheita foi o polímero Zeitag8819 por ser aquele com maior eficiência de remoção (Udom *et al.* 2013), a extração lipídica foi realizada através do método de CO₂SC por ter maior eficiência de extração e de dispensar o processo de secagem intensivo, não obstante o investimento inicial ser muito elevado. Finalmente foi utilizado o processo de transesterificação.

Tabela 23 - Processos e eficiências utilizadas no cenário otimista.

Cenário otimista		Referências
Conteúdo lipídico (%)	55	Amaro <i>et al.</i> 2011
Colheita		Udom <i>et al.</i> 2013
Floculante	Polímero Zeitag8819	
Eficiência (%)	98	
Extração lipídica		Brentner <i>et al.</i> 2011
Método utilizado	Extração por CO ₂ SC	
Eficiência (%)	98	
Conversão dos lípidos em biodiesel		Brentner <i>et al.</i> 2011
Método utilizado	Transesterificação	
Eficiência (%)	98	

5.4. Comparação dos resultados obtidos nos cenários considerados

De seguida são apresentadas as quantidades finais de biodiesel produzido por mês e por ano, de acordo com os cenários considerados.

Tabela 24 – Variáveis do modelo que influenciam a produtividade de biomassa e produção de biodiesel.

Produção final de biodiesel segundo cada cenário e área ocupada pelos reatores.

	Cenário conservativo		Cenário otimista	
	Remoção de nutrientes	Máxima produção de biodiesel	Remoção de nutrientes	Máxima produção de biodiesel
Concentração máxima (g/L)	2,0	2,0	2,0	2,0
Taxa de crescimento (dia⁻¹)	0,29	0,29	0,94	0,94
Θ (dia)	13	7,0	9,1	2,1
Conteúdo lipídico (%)	29	29	55	55
P (kg/m²/dia)	0,026	0,034	0,045	0,111
Biodiesel (t/mês)	2,4	3,1	9,60	23,4
Biodiesel (t/ano)	30	38	115	280
Área necessária (ha)	1,05	0,56	0,73	0,17

Para efeitos comparativos, foi selecionado o cenário otimista tendo em vista a remoção de nutrientes (CORN), isto porque, o objetivo principal será sempre a remoção de nutrientes.

De seguida é apresentada a comparação do biodiesel incorporado no setor dos transportes segundo a DGEG, com a quantidade de biodiesel produzida segundo CORN.

Podemos verificar através da tabela 25 que, tendo em conta os pressupostos assumidos pelo CORN, o contributo desta espécie de microalga para a produção de biodiesel é bastante reduzido. Contudo quando comparado com estudos anteriores mostra que houve uma evolução dos processos e um aumento da produtividade. Figueiredo (2011) calculou a área necessária para satisfazer 10% do consumo de gasóleo em Portugal usando culturas de Girassol em regadio e em sequeiro e Microalgas. Na tabela 26 é efetuada uma comparação dos resultados obtidos neste estudo com os resultados obtidos por Figueiredo (2011).

Tabela 25 – Biodiesel produzido segundo CORN e comparação com o biodiesel incorporado nos transportes.

	Total 2013 (ano ⁻¹)	Janeiro 2014 (mês ⁻¹)
Biodiesel incorporado (t)	301089	16636
Biodiesel produzido segundo CORN (t)	115	9,60
Incorporação (%)	0,038	0,058

Tabela 26 – Área necessária para incorporar 10% do biodiesel consumido em Portugal e comparação com o estudo de Figueiredo (2011)

Neste estudo		(Figueiredo 2011)		
		Girassol		Microalgas
		Regadio	Sequeiro	
P (t/ha/ano)	166	3	0,65	109,5
Área necessária (ha) para representar 10% de incorporação	2589	4949952	22845932	235992

A grande diferença na área necessária para incorporar 10% do gasóleo com biodiesel prende-se no facto de neste estudo terem sido utilizados fotobiorreactores flat-plate, que possuem uma maior produtividade por unidade de área. Contudo seria necessário o efluente proveniente de cerca de 7 milhões de habitantes, ou seja, mais de metade da população de Portugal, para satisfazer desta forma, 10% do consumo de gasóleo em Portugal.

5.5. Pegada de Carbono

O processo de tratamento de águas residuais, por si só, é um processo que tem emissões de GEE associadas, principalmente na energia despendida pelos equipamentos elétricos e pelos componentes químicos que têm de ser adicionados no processo de tratamento. As microalgas, como já foi referido, apresentam-se como bons sumidouros de carbono e a incorporação de dióxido de carbono no processo fotossintético pode mitigar parte das emissões de GEE provenientes dos sistemas de tratamento de águas residuais.

Flores-Alsina *et al.* (2011) calcularam as emissões de CO₂eq de uma ETAR cuja configuração é do tipo Ludzack-Ettinger modificada, onde o sistema de lamas ativadas é constituído por cinco tanques em série, dois anóxicos e três aeróbios. A ETAR possui ainda decantador secundário, digestor anaeróbio e unidade de espessamento de lamas. A concentração de NT afluente é de 15,05 g/m³ e a de

carência química de oxigénio (CQO) é de 49,19 g/m³. A concentração de fósforo afluyente não foi referida no estudo. As emissões de CO₂eq/m³ de água tratada são referidas na tabela 27.

Tabela 27 – Emissões de dióxido de carbono equivalente ao longo do processo de tratamento da ETAR referida e emissões totais segundo Flores-Alsina *et al.*, (2011).

Total emissões tratamento secundário (kgCO₂e/m³)	0,616
Processamento das lamas (kgCO₂e/m³)	0,231
Energia utilizada (kgCO₂e/m³)	0,311
GEE dos químicos (kgCO₂e/m³)	0,099
Deposição final das lamas (kgCO₂e/m³)	0,194
TOTAL (kgCO₂e/m³)	1,451
Q (m³/dia)	3200
Emissões (kgCO₂e/dia)	4643,20
Emissões (kgCO₂e/mês)	143939,20

Para calcularmos a quantidade de CO₂ retido pelas microalgas necessitamos de ter em conta a produtividade volumétrica (P_v), o volume (V) do reator e a quantidade de CO₂ necessária por cada grama de biomassa da biomassa algal no reator (α), que é igual a 1,833gCO₂ por grama de biomassa produzida (Arudchelvam e Nirmalakhandan 2013). Os mesmos autores propõem a seguinte fórmula para calcular a massa de CO₂ necessária para suportar determinada produtividade volumétrica:

$$M_{CO_2req} = \alpha \times P_v \times V \quad (eq. 12)$$

onde:

M_{CO_2req} - Massa de CO₂ fixado pelas microalgas (KgCO₂/dia)

α – Conteúdo de CO₂ da biomassa algal (gCO₂/g de biomassa)

P_v – Produtividade volumétrica (g/l/dia)

V – Volume afluyente ao reator (l)

Utilizando a equação 12 podemos então estimar a quantidade de CO₂ fixado segundo as diferentes produtividades volumétricas para cada cenário admitido. Os valores são apresentados na tabela 28:

Tabela 28 – Massa de CO₂ necessária para satisfazer as necessidades de carbono para atingir a produtividade volumétrica de cada cenário proposto.

Cenário conservativo			Cenário otimista	
	Remoção de nutrientes	Máxima produção de biodiesel	Remoção de nutrientes	Máxima produção de biodiesel
<i>P_v</i> (g/L/dia)	0,11	0,14	0,19	0,47
<i>M_{CO₂req}</i> (kgCO₂/dia)	656	836	1134	2757
<i>M_{CO₂req}</i> (kgCO₂/mês)	20324	25911	35143	85462

Contudo a quantidade de CO₂ fixada pelas microalgas, não pode ser abatida diretamente nas emissões de CO₂ da ETAR atendendo a que o processo de produção de microalgas também tem associado *inputs* energéticos que não podem deixar de ser contabilizados na pegada de carbono. Na tabela 29 são apresentados os consumos energéticos de cada processo para cada cenário segundo diferentes autores. Apenas no processo de extracção foi utilizado um método diferente.

Tabela 29 – Energia necessária em cada etapa para a produção de uma tonelada de biodiesel segundo os diferentes cenários.

	Cenário conservativo		Cenário otimista		Referencias
	Remoção de nutrientes	Máxima produção de biodiesel	Remoção de nutrientes	Máxima produção de biodiesel	
Arejamento (kWh/ton)	2203				Brentner <i>et al.</i> 2011
Lise celular (PEF) (kWh/ton)	60				Boer <i>et al.</i> 2012
Filtro de prensas (kWh/ton)	400				Lardon <i>et al.</i> 2009
Extração (kWh/ton)	239		7410		Brentner <i>et al.</i> 2011
Conversão (kWh/ton)	40,49				Brentner <i>et al.</i> 2011

A partir da energia despendida em cada processo e através de um fator de emissão, é possível estimar a quantidade de CO₂eq emitido por cada kWh consumido. Segundo a Agência Portuguesa do Ambiente (2011) em 2009 o fator de emissão equivalia a 375 t CO₂eq por cada GWh de energia consumido. Também é referido pela APA que na construção destes fatores apenas é contabilizada a energia elétrica produzida em território Português.

Utilizando o fator de emissão para Portugal podemos estimar as emissões do processo de produção de biodiesel a partir de microalgas (Tabela30).

Tabela 30 – Consumo energético mensal e respetivas emissões para os diferentes cenários propostos.

	Cenário conservativo		Cenário otimista	
	Remoção de nutrientes	Máxima	Remoção de nutrientes	Máxima
Produção de biodiesel (ton/mês)	2,4	3,1	9,60	23,4
Arejamento (kWh/mês)	5423	6913	21157	51450
Lise celular (PEF) (kWh/mês)	148	188	576	1401
Filtro de prensas (kWh/mês)	985	1255	3842	9343
Extração (kWh/mês)	588,12	749,79	71171	173075
Conversão (kWh/mês)	100	127	389	946
Total (kWh/mês)	7242	9234	97135	236214
Total emitido (kgCO₂eq/mês)	2716	3463	36426	88580
Total sequestrado (kgCO₂/mês)	20324	25911	35143	85462
Redução (kgCO₂eq/mês)	17608	22449	-1282	-3119

Podemos verificar que nos cenários otimistas a emissão é superior à remoção de CO₂, isto deve-se à escolha do processo utilizado na extracção do conteúdo lipídico das microalgas. A extração através de CO₂SC embora traga vantagens pela maior eficiência e pela não utilização de solventes orgânicos, que podem ser tóxicos para o meio ambiente, requer grandes *inputs* energéticos por tonelada de

biodiesel produzido, anulando qualquer vantagem na utilização de microalgas para a mitigação de emissão de GEE de uma ETAR.

Na tabela 31 podemos verificar a redução/aumento de CO₂eq para cada um dos diferentes cenários quando se incorpora a cultura de microalgas no tratamento de águas residuais. O cenário que obteve melhor resultado foi o cenário conservativo tendo em vista a produção máxima, que conseguiu reduzir em 15,6% as emissões de CO₂eq.

Tabela 31 – Emissões totais finais da ETAR associada à cultura de microalgas

	Cenário conservativo		Cenário otimista	
	Remoção de nutrientes	Máxima	Remoção de nutrientes	Máxima
Emissões (KgCO₂eq/mês)	126331	121491	145222	147058
Percentagem de redução (%)	12,2	15,6	-0,89	-2,17

De referir que neste caso, a utilização da extração dos lípidos através de CO₂SC torna o balanço de carbono negativo. O presente estudo indica que o pequeno aumento na eficiência (cerca de 7%) traz desvantagens no aumento do consumo energético e emissões de GEE. Assim sendo, no atual estado de arte, a substituição do processo de extração com hexano por CO₂SC não se justifica.

6. Conclusões e prespetivas de trabalho futuro

A presente dissertação teve como principal objetivo compreender qual o possível contributo da produção de biodiesel a partir de microalgas produzidas em águas residuais. Com esse intuito foi adotado um modelo que permite uma previsão da produtividade volumétrica em contínuo, a partir de dados obtidos a partir de culturas em descontínuo.

De forma a compreender todo o sistema de cultura e aspetos técnicos que influenciam a produtividade, foi realizada uma revisão bibliográfica. A partir dessa revisão foram selecionados os dados utilizados no balanço de massa proposto por Ruiz *et al.* (2013).

Em primeiro lugar, podemos concluir que as microalgas se apresentam como o potencial principal substituto dos biocombustíveis de primeira e segunda geração, principalmente por possuírem uma produtividade primária mais elevada. Contudo, os estudos abordados na presente dissertação mostram que no atual estado de arte, o biodiesel microalgal ainda sofre de alguns constrangimentos, que o impedem de se afirmar como substituto do biodiesel de primeira e segunda geração. Os balanços energéticos, apenas ligeiramente positivos para os elevados custos de produção por litro, mostram que ainda é necessário, não só uma melhoria na eficiência do sistema, como também, perceber como atingir a maior taxa de crescimento com maior conteúdo lipídico.

No passado recente têm surgido cada vez mais estudos com o intuito de superar alguns dos entraves tecnológicos que existem. Da avaliação desses estudos conclui-se o seguinte:

- A escolha da espécie de microalga é um passo fundamental. A espécie selecionada deve possuir uma elevada taxa de crescimento e ao mesmo tempo deve conseguir produzir uma grande quantidade de lípidos. A manipulação genética pode ser um caminho a seguir para a obtenção de uma espécie com as características ótimas para a produção de biodiesel. Contudo, a manipulação genética das microalgas com o intuito de aumentar o seu crescimento, resistência e aumento da produtividade lipídica, deve ser visto com redobrada precaução, pois a criação de uma microalga transgénica pode trazer riscos ambientais que ainda não foram equacionados e avaliados.
- O dimensionamento dos biorreactores é um dos aspetos mais relevantes pois está intimamente relacionado com a produtividade das microalgas. Têm sido propostos muitos tipos de reatores, mas aquele que parece mostrar a melhor razão entre robustez, produtividade, custo e qualidade do efluente final é o fotobiorreactor flat-plate, e por isso, utilizado industrialmente na produção de produtos de alto valor acrescentado. Se for adotado este sistema para a cultura industrial deve ser avaliada a possibilidade de construção do reator a partir de materiais mais ecológicos de forma a reduzir os possíveis impactes ambientais dos materiais utilizados. A dificuldade de previsão das produtividades

quando o biorreactor é utilizado em contínuo e à escala industrial é uma das grandes lacunas ainda existente nos estudos realizados.

- A utilização de águas residuais como fonte de nutrientes na cultura de microalgas constitui uma alternativa de baixo custo, uma vez que pode dispensar quase na totalidade a adição de nutrientes químicos e água potável, para além de que traz claras melhorias no desempenho ambiental do processo. Contudo, a inconstante concentração de nutrientes no afluente pode traduzir-se numa redução das taxas de crescimento.
- Existem vários fatores que podem influenciar a produtividade lipídica, nomeadamente a disponibilidade de CO₂, ausência de azoto, iluminação e salinidade.
 - A utilização de CO₂ proveniente de gases de combustão requer a utilização de um permutador de calor e de uma central de dessulfurização. O aumento da produtividade pode não compensar o custo de investimento, manutenção e operação deste sistema.
 - Foi reportado o aumento da quantidade de lípidos e redução da taxa de crescimento quando algumas espécies de microalgas se encontram na abstenção de azoto, assim sendo, propõe-se um sistema de cultura em duas fases, a primeira direcionada para a produtividade de biomassa e a segunda direcionada para o aumento do conteúdo lipídico. Esta opção pode tornar-se bastante dispendiosa por estarem a trabalhar dois sistemas em simultâneo, que não é fácil de implementar, operar e tem custos acrescidos.
 - A iluminação artificial do bioreactor também é possível, e a sua utilização e viabilidade dever ser avaliada para cada caso em particular. Podem ser utilizados sistemas de fibra ótica para a iluminação interna dos reatores, embora este sistema não necessite de energia elétrica a sua instalação e manutenção pode ser dispendiosa.
 - Na presente dissertação é reportado o aumento do conteúdo lipídico quando a espécie *Nannochloropsis oculata* é cultivada em ambientes salinos. Esta forma de potenciar o conteúdo lipídico só pode ser aplicada ou em microalgas marinhas ou em microalgas tolerantes a águas salobras. Os estudos acerca deste tipo de microalgas é ainda diminuto e por isso são aconselhados estudos a este respeito.
- A utilização de coagulantes/floculantes convencionais tem sido até agora a abordagem mais comum para a colheita da biomassa algal, embora surjam estudos acerca da utilização de biofloculantes. A utilização de biofloculantes pode trazer vantagens na produção de biocombustíveis, pois ajuda a mitigar a presença de compostos químicos indesejados nos produtos finais. A quitosana já mostrou ser um excelente biofloculante, com elevada taxa de recolha e com bom desempenho ambiental na sua utilização. Contudo, e apesar de serem necessárias baixas concentrações deste biofloculante, o preço por quilograma é ainda

demasiado elevado. Para além disso, os estudos não se revelaram totalmente esclarecedores no que diz respeito ao desempenho ambiental da sua produção. Sugerem-se assim estudos acerca do rendimento da produção de quitosana e os seus potenciais impactes. Sugere-se também trabalhos de pesquisa e teste de diferentes biofloculantes, como o proveniente da planta *Moringa oleifera* que foi relatado na presente dissertação.

- O processo de secagem pode ser um dos mais dispendiosos em termos energéticos. A secagem solar ou em leitos de secagem pode ser uma opção viável quando não se necessita de uma secagem intensiva, mas está sempre dependente de fatores climáticos. A extração húmida dos lípidos ou a utilização de HTL podem remover a necessidade de secagem da biomassa, mas enquanto estes processos ainda se encontram em fase embrionária, o método mais utilizado é a desidratação por filtro de prensas e aquele que apresenta melhor rendimento em relação à centrifugação ou filtração por vácuo.
- Solventes químicos, como o metanol, clorofórmio e hexano, ainda são o método mais utilizado de extração de lípidos da biomassa microalgal pois possuem boas eficiências de extração, não obstante os riscos ambientais dos solventes utilizados. A recolha e reutilização do solvente devem ser sempre praticadas, de forma a reduzir os custos e impactes ambientais. A forma mais recente de extração é a utilização de CO₂SC como solvente, esta técnica exige uma menor eficiência do processo de secagem e a separação do solvente faz-se por evaporação. Este método, embora tenha vantagens pela não utilização de solventes orgânicos utiliza grandes quantidades de energia para que o CO₂ atinja o ponto de pressão e temperatura críticos. A sua viabilidade económica a nível industrial parece ser difícil de atingir.
- A utilização de metanol para a transesterificação de lípidos em biodiesel é a tecnologia atualmente utilizada à escala comercial. É necessário um maior desenvolvimento desta tecnologia para minimizar a dependência de metanol durante a transesterificação, uma vez que o metanol geralmente deriva de combustíveis fósseis e apresenta riscos ambientais e problemas de saúde pública dada a sua toxicidade. Pode ainda ser utilizado o processo de transesterificação direta ou HTL, ambos os processos requerem grandes quantidades de energia e grandes investimentos. A sua viabilidade à escala industrial ainda não foi comprovada.

O interesse na produção de biodiesel a partir de microalgas tem sido cada vez maior e com os estudos realizados nos últimos anos prevê-se um aumento da rentabilidade da produção. Com o intuito de aumentar a rentabilidade, o aproveitamento dos resíduos provenientes da produção de biodiesel é extremamente importante. O aproveitamento energético dos resíduos pode ser realizado através de digestão anaeróbia ou através da HTL. A produção de biodiesel pode também ser incorporada num

conceito de biorefinaria, complementando a venda de combustíveis com a venda de produtos de valor acrescentado.

Segundo o modelo utilizado neste trabalho, podemos concluir que a concentração máxima de biomassa algal no meio de cultura é um dos aspetos que mais influencia a produtividade. O primeiro passo deverá ser a avaliação e seleção da espécie de microalga com maior potencial de concentração máxima em determinado afluente. De seguida, estudar quais os métodos específicos necessários, para aumentar a taxa de crescimento e percentagem lipídica. A montagem e funcionamento do fotobiorreactor deve tentar recriar as condições laboratoriais, tendo sempre como condicionante a variação das concentrações de nutrientes no afluente e o tempo de retenção hidráulico necessário para a sua remoção.

Devido à incerteza da qualidade do afluente ao biorreactor, este deve estar munido de sensores que permitam uma autorregulação do sistema, principalmente para evitar temperaturas e pH superior aos intervalos de tolerância e para evitar que ocorra wash-out da cultura. Para além disso, como qualquer sistema em contínuo, o sistema de cultura de microalgas necessita de sofrer afinações ao longo do tempo de funcionamento e por isso, qualquer sistema de cultura de biomassa algal deve estar munido de um laboratório de análises rápidas.

Conclui-se também que a cultura de microalgas em sistemas de tratamento de águas residuais pode trazer vantagens na mitigação da emissão de GEE, contudo depende dos processos utilizados na cultura e no processamento da biomassa, pois estes têm um impacto direto na mitigação, podendo até aumentar a emissão de GEE. A capacidade de remoção de CO₂ está intrinsecamente ligada com a produtividade, e quanto maior esta for, maior será a fixação de CO₂.

A contribuição de biodiesel a partir de microalgas cultivadas em águas residuais prevista neste trabalho está longe de ser satisfatória. Contudo, preveem-se melhorias consideráveis num futuro próximo, principalmente se se continuar a verificar o aumento no custo de exploração das reservas de petróleo, que origina investimento na I&D de outras tecnologias.

7. Bibliografia

- Abdel-Raouf, N., a.a. Al-Homaidan, and I.B.M. Ibraheem. 2012. "Microalgae and Wastewater Treatment." *Saudi Journal of Biological Sciences* 19 (3) (July): 257–275. doi:10.1016/j.sjbs.2012.04.005. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1319562X12000332>.
- Ahmad, A.L., N.H. Mat Yasin, C.J.C. Derek, and J.K. Lim. 2011. "Optimization of Microalgae Coagulation Process Using Chitosan." *Chemical Engineering Journal* 173 (3) (October): 879–882. doi:10.1016/j.cej.2011.07.070. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1385894711009144>.
- Almeida, Pedro de, and Pedro D. Silva. 2009. "The Peak of Oil production—Timings and Market Recognition." *Energy Policy* 37 (4) (April): 1267–1276. doi:10.1016/j.enpol.2008.11.016. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301421508006630>.
- Amaro, Helena M., a. Catarina Guedes, and F. Xavier Malcata. 2011. "Advances and Perspectives in Using Microalgae to Produce Biodiesel." *Applied Energy* 88 (10) (October): 3402–3410. doi:10.1016/j.apenergy.2010.12.014. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306261910005210>.
- Andersen, Robert A. 2005. *Algal Culturing Techniques*. Elsevier.
- APA. 2011. "Fatores de Emissão Associados Ao Consumo de Energia Elétrica." <http://www.apambiente.pt/index.php?ref=17&subref=150>. Acedido a 22 de abril 2014
- Armah, Paul, Aaron Archer, and Gregory C. Phillips. 2009. "Drivers Leading to Higher Food Prices: Biofuels Are Not the Main Factor." *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 45 (3) (May 22): 330–341. doi:10.1007/s11627-009-9211-0. <http://link.springer.com/10.1007/s11627-009-9211-0>.
- Arudchelvam, Yalini, and Nagamany Nirmalakhandan. 2013. "Energetic Optimization of Microalgal Cultivation in Photobioreactors for Biodiesel Production." *Renewable Energy* 56 (August): 77–84. doi:10.1016/j.renene.2012.09.042. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960148112006131>.
- Beach, Evan S, Matthew J Eckelman, Zheng Cui, Laura Brentner, and Julie B Zimmerman. 2012. "Preferential Technological and Life Cycle Environmental Performance of Chitosan Flocculation for Harvesting of the Green Algae *Nannochloris oleoabundans*." *Bioresource Technology* 121 (October): 445–9. doi:10.1016/j.biortech.2012.06.012. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22853967>.
- Bligh, E. G., and W.J. Dyer. 1959. "Extraction of Lipids in Solution by the Method of Bligh & Dyer" 2: 1959.
- Boer, Karne, Navid Reza Moheimani, Michael Armin Borowitzka, and Parisa Arabzadeh Bahri. 2012. "Extraction and Conversion Pathways for Microalgae to Biodiesel: a Review Focused on Energy Consumption." *Journal of Applied Phycology* 24 (6) (April 19): 1681–1698. doi:10.1007/s10811-012-9835-z. <http://link.springer.com/10.1007/s10811-012-9835-z>.
- Brennan, Liam, and Philip Owende. 2010. "Biofuels from microalgae—A Review of Technologies for Production, Processing, and Extractions of Biofuels and Co-products." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14 (2) (February): 557–577. doi:10.1016/j.rser.2009.10.009. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032109002408>.

- Brentner, Laura B, Matthew J Eckelman, and Julie B Zimmerman. 2011. "Combinatorial Life Cycle Assessment to Inform Process Design of Industrial Production of Algal Biodiesel." *Environmental Science & Technology* 45 (16) (August 15): 7060–7. doi:10.1021/es2006995. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21662987>.
- Carvalho, Ana P, Luís a Meireles, and F Xavier Malcata. 2006. "Microalgal Reactors: a Review of Enclosed System Designs and Performances." *Biotechnology Progress* 22 (6): 1490–506. doi:10.1021/bp060065r. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17137294>.
- Cheirsilp, Benjamas, and Salwa Torpee. 2012. "Enhanced Growth and Lipid Production of Microalgae Under Mixotrophic Culture Condition: Effect of Light Intensity, Glucose Concentration and Fed-batch Cultivation." *Bioresource Technology* 110 (April): 510–6. doi:10.1016/j.biortech.2012.01.125. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22361073>.
- Chen, Chun-Yen, Kuei-Ling Yeh, Rifka Aisyah, Duu-Jong Lee, and Jo-Shu Chang. 2011. "Cultivation, Photobioreactor Design and Harvesting of Microalgae for Biodiesel Production: a Critical Review." *Bioresource Technology* 102 (1) (January): 71–81. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.159. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20674344>.
- Chisti, Yusuf. 2007. "Biodiesel from Microalgae." *Biotechnology Advances* 25 (3): 294–306. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.02.001. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17350212>.
- Chisti, Yusuf. 2008. "Biodiesel from Microalgae Beats Bioethanol." *Trends in Biotechnology* 26 (3) (March): 126–31. doi:10.1016/j.tibtech.2007.12.002. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18221809>.
- Chojnacka, Katarzyna, and Facundo-Joaquin Marquez-Rocha. 2004. "Kinetic and Stoichiometric Relationships Of the Energy and Carbon Metabolism in the Culture of Microalgae." *Biotechnology* 3 (1): 21–34.
- Clarens, Andres F, Eleazer P Resurreccion, Mark a White, and Lisa M Colosi. 2010. "Environmental Life Cycle Comparison of Algae to Other Bioenergy Feedstocks." *Environmental Science & Technology* 44 (5) (March 1): 1813–9. doi:10.1021/es902838n. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20085253>.
- Collet, Pierre, Arnaud Hélias, Laurent Lardon, Monique Ras, Romy-Alice Goy, and Jean-Philippe Steyer. 2011. "Life-cycle Assessment of Microalgae Culture Coupled to Biogas Production." *Bioresource Technology* 102 (1) (January): 207–14. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.154. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20674343>.
- Delrue, F, Y Li-Beisson, P-a Setier, C Sahut, a Roubaud, a-K Froment, and G Peltier. 2013. "Comparison of Various Microalgae Liquid Biofuel Production Pathways Based on Energetic, Economic and Environmental Criteria." *Bioresource Technology* 136 (May): 205–12. doi:10.1016/j.biortech.2013.02.091. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23567683>.
- Delrue, F, P-a Setier, C Sahut, L Cournac, a Roubaud, G Peltier, and a-K Froment. 2012. "An Economic, Sustainability, and Energetic Model of Biodiesel Production from Microalgae." *Bioresource Technology* 111 (May): 191–200. doi:10.1016/j.biortech.2012.02.020. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22366604>.
- Devi, M Prathima, and S Venkata Mohan. 2012. "CO₂ Supplementation to Domestic Wastewater Enhances Microalgae Lipid Accumulation Under Mixotrophic Microenvironment: Effect of Sparging Period and Interval." *Bioresource Technology* 112 (May): 116–23. doi:10.1016/j.biortech.2012.02.095. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22440578>.

- Diário Económico. 2011. “Alemanha Abandona Nuclear até 2022.” http://economico.sapo.pt/noticias/alemanha-abandona-nuclear-ate-2022_119350.html. Acedido a 9 de julho de 2013
- Direcção Geral de Energia e Geologia. 2014. “Estatísticas-Petróleo e Derivados-Vendas Mensais.” <http://www.dgeg.pt/>. Acedido a 9 de abril de 2014
- Divakaran, Ravi, and V N Sivasankara Pillai. 2002. “Flocculation of Algae Using Chitosan.” *Journal of Applied Phycology* (14): 419–422.
- Dunahay, Terri G, Eric E Jarvls, Sonja S Dais, and Paul G Roessler. 1996. “Manipulation of Microalgal Lipid Production Using Genetic Engineering.” *Applied Biochemistry and Biotechnology* 57.
- Feng, Yujie, Chao Li, and Dawei Zhang. 2011. “Lipid Production of Chlorella Vulgaris Cultured in Artificial Wastewater Medium.” *Bioresource Technology* 102 (1) (January): 101–5. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.016. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20620053>.
- Figueiredo, Filipa Daniela Francisco de. 2011. “Biodiesel de Girassol Ou Microalgas Em Portugal: Uma Avaliação Comparativa de Ciclo de Vida”. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.
- Flores-Alsina, Xavier, Lluís Corominas, Laura Snip, and Peter a Vanrolleghem. 2011. “Including Greenhouse Gas Emissions During Benchmarking of Wastewater Treatment Plant Control Strategies.” *Water Research* 45 (16) (October 15): 4700–10. doi:10.1016/j.watres.2011.04.040. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21851960>.
- Franco, André Luiz Custódio, Ivon Pinheiro Lôbo, Rosenira Serpa da Cruz, Cláudia Maria Luz Lapa Teixeira, José Adolfo de Almeida Neto, and Rafael Silva Menezes. 2013. “Biodiesel de Microalgas: Avanços e Desafios.” *Química Nova* 36 (3): 437–448.
- Gause, G F. 1934. *The Struggle for Existence*. Edited by Baltimore: Williams and Wilkins.
- Geris, Regina, Nádia Alessandra, Bruno Andrade Amaral, Isabelle De Souza Maia, Vinicius Dourado, José Roque, Mota Carvalho, and Salvador Ba. 2007. “Biodiesel de Soja - Reacção de Transesterificação Para Aulas Práticas de Química Orgânica.” *Química Nova* 30 (5): 1369–1373.
- Gouveia, Luisa, and Ana Cristina Oliveira. 2009. “Microalgae as a Raw Material for Biofuels Production.” *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 36 (2) (February): 269–74. doi:10.1007/s10295-008-0495-6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18982369>.
- Halim, Ronald, Michael K Danquah, and Paul a Webley. 2012. “Extraction of Oil from Microalgae for Biodiesel Production: A Review.” *Biotechnology Advances* 30 (3): 709–32. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.01.001. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22266377>.
- Harto, Christopher, Robert Meyers, and Eric Williams. 2010. “Life Cycle Water Use of Low-carbon Transport Fuels.” *Energy Policy* 38 (9) (September): 4933–4944. doi:10.1016/j.enpol.2010.03.074. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301421510002648>.
- Hochman, Gal, Scott Kaplan, Deepak Rajagopal, and David Zilberman. 2012. “Biofuel and Food-Commodity Prices.” *Agriculture* 2 (4) (September 24): 272–281. doi:10.3390/agriculture2030272. <http://www.mdpi.com/2077-0472/2/3/272/>.

- Hu, Qiang, Milton Sommerfeld, Eric Jarvis, Maria Ghirardi, Matthew Posewitz, Michael Seibert, and Al Darzins. 2008. "Microalgal Triacylglycerols as Feedstocks for Biofuel Production: Perspectives and Advances." *The Plant Journal : for Cell and Molecular Biology* 54 (4) (May): 621–39. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18476868>.
- IEA. 2012a. "WORLD ENERGY OUTLOOK 2012". Paris.
- IEA. 2012b. "IEA Database." http://wds.iea.org/wds/ReportFolders/ReportFolders.aspx?CS_referer=&CS_ChosenLang=en. Acedido a 6 de julho de 2013
- IEA. 2012c. "Key World Energy Statistics". Paris.
- INTESUSAL. 2014. "INTESUSAL." <http://intesusal-algae.eu/home/>. Acedido a 9 de março de 2014
- Jornal da Madeira. 2011. "Biocombustível Diminui Dependência Do Exterior." <http://www.netmadeira.com/noticias/destaques/2011/10/6/biocombustivel-diminui-dependencia-do-exterior>. Acedido a 13 de fevereiro de 2014
- Jorquera, Orlando, Asher Kiperstok, Emerson a Sales, Marcelo Embiruçu, and Maria L Ghirardi. 2010. "Comparative Energy Life-cycle Analyses of Microalgal Biomass Production in Open Ponds and Photobioreactors." *Bioresource Technology* 101 (4) (February): 1406–13. doi:10.1016/j.biortech.2009.09.038. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19800784>.
- Keyzer, Michiel A., Max D. Merbis, and Roelf L. Voortman. 2008. "The Biofuel Controversy."
- Knothe, Gerhard. 2001. "Historical Perspectives on Vegetable Oil-Based Diesel Fuels." *Inform* 12: 103–107.
- Lam, Man Kee, Keat Teong Lee, and Abdul Rahman Mohamed. 2012. "Current Status and Challenges on Microalgae-based Carbon Capture." *International Journal of Greenhouse Gas Control* 10 (September): 456–469. doi:10.1016/j.ijggc.2012.07.010. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1750583612001673>.
- Lardon, Laurent, Arnaud Hélias, Bruno Sialve, Jean-Philippe Steyer, and Oliver Bernard. 2009. "Policy Analysis Life-Cycle Assessment of Biodiesel Production from Microalgae." *Environmental Science & Technology* 43 (17): 6475–6481.
- Lee, Yuan-Kun, Sun-Yeun Ding, Chin-Seng Low, Yoon-Ching Chang, Wayne L. Forday, and Poo-Chin Chew. 1995. "Design and Performance of an A-type Tubular Photobioreactor for Mass Cultivation of Microalgae." *Journal of Applied Phycology* 7 (1) (February): 47–51. doi:10.1007/BF00003549. <http://link.springer.com/10.1007/BF00003549>.
- Li, Yecong, Wenguang Zhou, Bing Hu, Min Min, Paul Chen, and Roger R Ruan. 2011. "Integration of Algae Cultivation as Biodiesel Production Feedstock with Municipal Wastewater Treatment: Strains Screening and Significance Evaluation of Environmental Factors." *Bioresource Technology* 102 (23) (December): 10861–7. doi:10.1016/j.biortech.2011.09.064. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21982450>.
- Liang, Yanna, Nicolas Sarkany, and Yi Cui. 2009. "Biomass and Lipid Productivities of *Chlorella Vulgaris* Under Autotrophic, Heterotrophic and Mixotrophic Growth Conditions." *Biotechnology Letters*. doi:10.1007/s10529-009-9975-7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19322523>.

- Liu, Xiaojuan, Shunshan Duan, Aifen Li, Ning Xu, Zhuoping Cai, and Zhangxi Hu. 2008. "Effects of Organic Carbon Sources on Growth, Photosynthesis, and Respiration of *Phaeodactylum Tricornutum*." *Journal of Applied Phycology* 21 (2) (September 6): 239–246. doi:10.1007/s10811-008-9355-z. <http://link.springer.com/10.1007/s10811-008-9355-z>.
- López Barreiro, Diego, Wolter Prins, Frederik Ronsse, and Wim Brilman. 2013. "Hydrothermal Liquefaction (HTL) of Microalgae for Biofuel Production: State of the Art Review and Future Prospects." *Biomass and Bioenergy* 53 (0) (June): 113–127. doi:10.1016/j.biombioe.2012.12.029. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0961953412005272>.
- Madigan, Daniel J, Nicholas S Fisher, and Zofia Baumann. 2012. "Pacific Bluefin Tuna Transport Fukushima-derived Radionuclides from Japan to California." *PNAS* 109 (24): 9483–9486. doi:10.1073/pnas.1204859109.
- Mata, Teresa M., António a. Martins, and Nidia. S. Caetano. 2010. "Microalgae for Biodiesel Production and Other Applications: A Review." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14 (1) (January): 217–232. doi:10.1016/j.rser.2009.07.020. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032109001646>.
- Miranda, João Ricardo Pereira de Cabral. 2011. "Produção de Bioetanol a Partir Da Microalga *Scenedesmus Obliquus*". Universidade Nova de Lisboa - Faculdade de Ciências e Tecnologia.
- Moazami, Nasrin, Alireza Ashori, Reza Ranjbar, Mehrnoush Tangestani, Roghieh Eghtesadi, and Ali Sheykhi Nejad. 2012. "Large-scale Biodiesel Production Using Microalgae Biomass of *Nannochloropsis*." *Biomass and Bioenergy* 39 (April): 449–453. doi:10.1016/j.biombioe.2012.01.046. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0961953412000669>.
- Mostafa, Soha S M. 2012. "Microalgal Biotechnology : Prospects and Applications." *Intech*.
- Naik, S.N., Vaibhav V. Goud, Prasant K. Rout, and Ajay K. Dalai. 2010. "Production of First and Second Generation Biofuels: A Comprehensive Review." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14 (2) (February): 578–597. doi:10.1016/j.rser.2009.10.003. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032109002342>.
- Necton. 2014. "RESEARCH & DEVELOPMENT." http://phytobloom.com/research_development/. Acedido a 13 de março de 2014
- Peralta-Ruiz, Y., a.-D. González-Delgado, and V. Kafarov. 2013. "Evaluation of Alternatives for Microalgae Oil Extraction Based on Exergy Analysis." *Applied Energy* 101 (January): 226–236. doi:10.1016/j.apenergy.2012.06.065. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306261912005107>.
- Ramalho, Fábio Manuel Pereira. 2013. "Avaliação Ambiental Do Uso de Microalgas Na Produção de Biodiesel : Revisão Bibliográfica Sistemática". Universidade Nova de Lisboa - Faculdade de Ciência e Tecnologia.
- Razon, Luis F., and Raymond R. Tan. 2011. "Net Energy Analysis of the Production of Biodiesel and Biogas from the Microalgae: *Haematococcus Pluvialis* and *Nannochloropsis*." *Applied Energy* 88 (10) (October): 3507–3514. doi:10.1016/j.apenergy.2010.12.052. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306261910005726>.

- Reinhardt, Guido, Nils Rettenmaier, Sven Gärtner, and Andreas Pastowski. 2007. "Rain Forest for Biodiesel ? Ecological Effects of Using Palm Oil as a Source of Energy."
- Ruiz, J, P D Álvarez-Díaz, Z Arbib, C Garrido-Pérez, J Barragán, and J a Perales. 2013. "Performance of a Flat Panel Reactor in the Continuous Culture of Microalgae in Urban Wastewater: Prediction from a Batch Experiment." *Bioresource Technology* 127 (January): 456–63. doi:10.1016/j.biortech.2012.09.103. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23138070>.
- Ruiz-Marin, Alejandro, Leopoldo G Mendoza-Espinosa, and Tom Stephenson. 2010. "Growth and Nutrient Removal in Free and Immobilized Green Algae in Batch and Semi-continuous Cultures Treating Real Wastewater." *Bioresource Technology* 101 (1) (January): 58–64. doi:10.1016/j.biortech.2009.02.076. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19699635>.
- Schenk, Peer M., Skye R. Thomas-Hall, Evan Stephens, Ute C. Marx, Jan H. Mussnug, Clemens Posten, Olaf Kruse, and Ben Hankamer. 2008. "Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production." *BioEnergy Research* 1 (1) (March 4): 20–43. doi:10.1007/s12155-008-9008-8. <http://link.springer.com/10.1007/s12155-008-9008-8>.
- Schnoor, Jerald L. 2006. "Biofuels and the Environment." *Environmental Science & Technology*: 4042.
- Sheehan, John, Terri Dunahay, John Benemann, and Paul Roessler. 1998. "A Look Back at the U . S . Department of Energy ' s Aquatic Species Program : Biodiesel from Algae."
- Singh, R.N., and Shaishav Sharma. 2012. "Development of Suitable Photobioreactor for Algae Production – A Review." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16 (4) (May): 2347–2353. doi:10.1016/j.rser.2012.01.026. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032112000275>.
- Songstad, D. D., P. Lakshmanan, J. Chen, W. Gibbons, S. Hughes, and R. Nelson. 2009. "Historical Perspective of Biofuels: Learning from the Past to Rediscover the Future." *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 45 (3) (May 23): 189–192. doi:10.1007/s11627-009-9218-6. <http://link.springer.com/10.1007/s11627-009-9218-6>.
- Soratana, Kullapa, Willie F Harper Jr, and Amy E Landis. 2012. "Microalgal Biodiesel and the Renewable Fuel Standard ' s Greenhouse Gas Requirement." *Energy Policy* 46: 498–510. doi:10.1016/j.enpol.2012.04.016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enpol.2012.04.016>.
- Spolaore, Pauline, Claire Joannis-Cassan, Elie Duran, and Arsène Isambert. 2006. "Commercial Applications of Microalgae." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101 (2) (February): 87–96. doi:10.1263/jbb.101.87. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16569602>.
- Su, Chia-Hung, Liang-Jung Chien, James Gomes, Yu-Sheng Lin, Yuan-Kun Yu, Jhang-Song Liou, and Rong-Jhih Syu. 2010. "Factors Affecting Lipid Accumulation by *Nannochloropsis Oculata* in a Two-stage Cultivation Process." *Journal of Applied Phycology* 23 (5) (October 8): 903–908. doi:10.1007/s10811-010-9609-4. <http://link.springer.com/10.1007/s10811-010-9609-4>.
- Tang, Haiying, Meng Chen, M E D Garcia, Nadia Abunasser, K Y Simon Ng, and Steven O Salley. 2011. "Culture of Microalgae *Chlorella Minutissima* for Biodiesel Feedstock Production." *Biotechnology and Bioengineering* 108 (10) (April 14): 2280–2287. doi:10.1002/bit.23160. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21495011>.
- Udom, Innocent, Behnaz H Zaribaf, Trina Halfhide, Benjamin Gillie, Omatoyo Dalrymple, Qiong Zhang, and Sarina J Ergas. 2013. "Harvesting Microalgae Grown on Wastewater." *Bioresource*

- Technology* 139 (July): 101–6. doi:10.1016/j.biortech.2013.04.002.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23648758>.
- Wang, Bei, Christopher Q Lan, and Mark Horsman. 2012. “Closed Photobioreactors for Production of Microalgal Biomasses.” *Biotechnology Advances* 30 (4): 904–12.
 doi:10.1016/j.biotechadv.2012.01.019. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22306165>.
- Wang, R. 1988. “Development of Biodiesel Fuel.” *Taiyangneng Xuebao* 9: 434–436.
- White, Mel. 2008. “Borneo’s Moment of Truth.” *National Geographic*.
<http://ngm.nationalgeographic.com/2008/11/borneo/white-text/1#close-modal>.
- Wu, Li Fen, Pei Chung Chen, Ai Ping Huang, and Chi Mei Lee. 2012. “The Feasibility of Biodiesel Production by Microalgae Using Industrial Wastewater.” *Bioresource Technology* 113 (June): 14–8. doi:10.1016/j.biortech.2011.12.128. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22269054>.
- WWI. 2006. “BIOFUELS FOR TRANSPORTATION GLOBAL POTENTIAL AND IMPLICATIONS FOR SUSTAINABLE AGRICULTURE AND ENERGY IN THE 21st CENTURY”. Washington, D.C.
- Xie, Jingli, Yuanxing Zhang, Yuanguang Li, and Yonghong Wang. 2001. “Mixotrophic Cultivation of *Platymonas Subcordiformis*.” *Journal of Applied Phycology* 13 (4): 343–347.
 doi:10.1023/A:1017532302360.
- Yang, Jia, Ming Xu, Xuezhi Zhang, Qiang Hu, Milton Sommerfeld, and Yongsheng Chen. 2011. “Life-cycle Analysis on Biodiesel Production from Microalgae: Water Footprint and Nutrients Balance.” *Bioresource Technology* 102 (1) (January): 159–65.
 doi:10.1016/j.biortech.2010.07.017. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20675125>.